

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/81425 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 17/12, B01D 71/74

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT01/00122

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. April 2001 (24.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 732/2000 26. April 2000 (26.04.2000) AT

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SLEYTR, Uwe, B. [AT/AT]; Industriestrasse 137, Parz. 14, A-1220 Wien (AT). SARA, Margit [AT/AT]; Watzekgasse 84, A-2230 Gänserndorf (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MADER, Christoph [AT/AT]; Pyrker gasse 13/10, A-1190 Wien (AT). SCHUSTER, Bernhard [AT/AT]; Trillergasse 4/2/35, A-1210 Wien (AT). UNGER, Frank, M. [AT/AT]; Gentzgasse 129/II/33, A-1180 Wien (AT).

(74) Anwalt: ITZE, Peter; c/o Patentanwälte Casati Wilhelm, Itze Peter, Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A SECONDARY CELL WALL POLYMER OF PROCARYOTIC MICROORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON SEKUNDÄREM ZELLWANDPOLYMER PROKARYONTISCHER MIKROORGANISMEN

(57) Abstract: The invention concerns the use of a secondary cell wall polymer for oriented monomolecular bonding of molecular layers and/or addition of molecules of a carrier. The invention also concerns a composite body produced according to the invention.

(57) Zusammenfassung: Verwendung von sekundärem Zellwandpolymer zur orientierten monomolekularen Bindung von Molekülen, vorzugsweise Molekülschichten und/oder der Anlagerung von Molekülen an Molekülen eines Trägers, sowie ein gemäß dieser Verwendung angefertigter Verbundkörper.

WO 01/81425 A1

Verwendung von sekundärem Zellwandpolymer prokaryontischer Mikroorganismen

Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von sekundärem Zellwandpolymer prokaryontischer Mikroorganismen sowie auf Verbundkörper aus einem Träger und einer Molekülschicht.

Kristalline Zelloberflächenschichten (sogenannte S-Schichten; "S" für surface) zählen zu den häufigsten Oberflächenstrukturen prokaryontischer Organismen (Archaeobakterien und Eubakterien). S-Schichten sind aus einer einzigen Protein- oder Glykoproteinspezies (Mr ca. 50.000 bis 200.000) aufgebaut. [Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum and M. Sára. (eds) 1996. Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins. In: Molecular Biology Intelligence Unit. Academic Press, R.G. Landes Company, Austin, USA.; Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum and M. Sára. 1999. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. Angew. Chem. Int. Ed. 38:1034-1054. ;Sleytr, U.B. and T.J. Beveridge. 1999. Bacterial S-layers. Trends Microbiol. 7(6):253-260.] Isolierte S-Schicht (Glyko)Proteine zahlreicher Organismen haben die Fähigkeit zur Selbstorganisation zu monomolekularen kristallinen Gittern in Suspension, auf festen Trägern (z.B. Silizium-Wafern, Polymeren, Metallen), an der Wasser-/Luftgrenzfläche sowie gespreiteten Lipidfilmen und Liposomen. Die Poren der S-Schichten sind von regelmäßiger Größe und Morphologie. Permeabilitätsuntersuchungen haben gezeigt, daß S-Schichten scharfe Molekülmassentrenngrenzen im Ultrafiltrationsbereich aufweisen. Diese Eigenschaften haben auch zur Nutzung von S-Schichten für die Herstellung von Ultrafiltrationsmembranen geführt (europäische Patentschrift Nr. 0 154 620 B1).

Umfangreiche Vorversuche haben gezeigt, daß S-Schicht (Glyko)Proteine von zahlreichen Bacillaceae auf gespreiteten Lipidfilmen (z.B. Phospholipide, Tetraetherlipide und anderen amphiphilen Molekülen) rekristallisiert werden können. Dazu werden die Lipide zunächst in einem Trog an der Wasser-/Luftgrenzfläche nach der Langmuir-Technik in Form einer monomolekularen Schicht gespreitet. Für die Rekristallisation von S-Schicht (Glyko)Proteinen an den Lipidfilm kann es von Vorteil sein, daß der gespreitete Lipidfilm zwischen Barrieren auf einen definierten Spreitungsdruck eingestellt wird. Zur Rekristallisation der S-Schicht (Glyko)Proteine auf dem gespreiteten Lipidfilm werden die gelösten S-Schicht(Glyko)Proteine in die Subphase eingebracht, wo sie entweder durch

Diffusion oder durch aktive Mischung der Subphase an den gespreiteten Lipidfilm gelangen. Der pH-Wert, die Ionenstärke und die Ionenzusammensetzung der Subphase können dabei einen Einfluß auf das Rekristallisationsverhalten der S-Schicht (Glyko)Proteine haben. [Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum and M. Sára. (eds) 1996. Crystalline Bacterial Cell Surface
5 Proteins. In: Molecular Biology Intelligence Unit. Academic Press, R.G. Landes Company, Austin, USA.; Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum and M. Sára. 1999. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. Angew. Chem. Int. Ed. 38:1034-1054. ;Sleytr, U.B. and T.J. Beveridge. 1999. Bacterial S-layers. Trends Microbiol. 7(6):253-260.]

10 Die Rekristallisation in Form einer geschlossenen monomolekularen S-Schicht erfolgt von Nukleationskeimen (Kristallite) aus. Die einzelnen kristallinen S-Schichtdomänen wachsen dabei so lange, bis sie aufeinander treffen und sich zu einer zusammenhängenden Schicht vereinen. Bei der Rekristallisation von S-Schichten können in Abhängigkeit von den gewählten Bedingungen auch Doppelschichten entstehen, wobei die
15 einzelnen Schichten sich mit der Innen- oder Außenseite verbinden können. Vorversuche haben gezeigt, daß S-Schicht-unterstützte Lipidfilme eine wesentlich höhere mechanische Stabilität als "nackte" Lipidfilme aufweisen. Weitere Vorversuche haben gezeigt, daß durch die Rekristallisation einer S-Schicht die Funktionalität von Lipidmembranen nicht beeinträchtigt wird. So werden die spezifische Leitfähigkeit und spezifische Kapazität von
20 Lipidmembranen im Zuge der Ausbildung einer zusammenhängenden assoziierten S-Schicht nicht signifikant verändert Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum and M. Sára. 1999. Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. Angew. Chem. Int. Ed. 38:1034-1054. [Schuster, B., U.B. Sleytr, A. Diederich, G. Bähr, and M. Winterhalter. 1999. Probing the stability of S-layer-supported
25 planar lipid membranes. Eur. Biophys. J. 28:583-590.; Pum, D. and U.B. Sleytr. 1999. The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. Trends Biotechnol. 17: 8-12.] Weiters lassen sich funktionelle Moleküle sowohl vor als auch nach der Rekristallisation von S-Schichten in die Lipidmembranen einbauen. Diese Funktionalitätsuntersuchungen wurden sowohl mit Hilfe der Voltage-Clamp als auch mit der Black-Lipid Membrane
30 Technik durchgeführt. [Schuster, B., D. Pum and U.B. Sleytr. 1998. Voltage clamp studies on S-layer supported tetraether lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta 1369: 51-60.; Schuster, B., D. Pum, O. Braha, H. Bayley and U.B. Sleytr. 1998. Self-assembled α -hemolysin pores in an S-layer-supported lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta 1370: 280-288.] Dabei konnte

am Beispiel von α -Hämolysin (α -HL) gezeigt werden, daß sich diese heptameren Poren (aus sieben identen α -HL Molekülen bestehende Transmembranporen) nur dann ausbilden, wenn die porenbildenden Moleküle von der Lipidseite angehoben werden. Aufgrund der im Ultrafiltrationsbereich liegenden molekularen Siebwirkung der S-Schicht können die α -HL-Moleküle jedoch nicht durch das S-Schichtgitter zur Lipidmembran vordringen. Hingegen konnte gezeigt werden, daß sich kleinere Moleküle (z.B. Ionenkanäle wie Valinomycin), von beiden Seiten aus angehoben, in die Lipidmembran einbauen und in der Folge als funktionelle Ionenkanäle mit elektrophysiologischen Methoden gemessen werden können. Die Wechselwirkung zwischen monomolekularen und bimolekularen Lipidfilmen (einschließlich von Mischungen mit anderen amphiphilen Molekülen, wie z.B. Hexadecylamin) und Liposomen mit S-Schicht (Glyko)Proteingittern wurden bisher mit einem breiten Spektrum biophysikalischer Methoden untersucht Hirn, R., B. Schuster, U.B. Sleytr and T.M. Bayerl. 1999. The effect of S-layer protein adsorption and crystallization on the collective motion of a planar lipid bilayer studied by dynamic light scattering. *Biophys. J.* 77:2066-2074. [Schuster, B., U.B. Sleytr, A. Diederich, G. Bähr, and M. Winterhalter. 1999. Probing the stability of S-layer-supported planar lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 28:583-590.; Hianik, T., S. Küpcü, U.B. Sleytr, P. Rybár, R. Krivánek and U. Kaatze. 1999. Interaction of crystalline bacterial cell surface proteins with lipid bilayers in liposomes. A sound velocity study. *Colloids Surfaces A* 147:331-339.; Mader, C., S. Küpcü, M. Sára and U.B. Sleytr. 1999. Stabilizing effect of an S-layer on liposomes towards thermal or mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1418:106-116.; Györvary, E., B. Wetzter, U.B. Sleytr, A. Sinner, A. Offenhäusser and W. Knoll. 1999. Lateral diffusion of lipids in silane-, dextran- and S-layer-supported mono- and bilayers. *Langmuir* 15:1337-1347.; Weygand, M., B. Wetzter, D. Pum, U.B. Sleytr, N. Cuvillier, K. Kjaer, P.B. Howes and M. Lösche. 1999. Bacterial S-layer protein coupling to lipids: X-ray reflectivity and grazing incidence diffraction studies. *Biophys. J.* 76: 458-468.; Wetzter, B., A. Pfandler, E. Györvary, D. Pum, M. Lösche and U.B. Sleytr. 1998. S-layer reconstitution at phospholipid monolayers. *Langmuir*. 14: 6899-6906.] Dabei zeigte sich, daß durch die Rekristallisation eines S-Schichtgitters die Eigenschaften des Lipidfilmes (z.B. Fluidität) und molekulare Ordnung wesentlich beeinflußt werden können [Györvary, E., B. Wetzter, U.B. Sleytr, A. Sinner, A. Offenhäusser and W. Knoll. 1999. Lateral diffusion of lipids in silane-, dextran- and S-layer-supported mono- and bilayers. *Langmuir* 15:1337-1347]. S-Schicht-unterstützte Lipidmembranen entsprechen im wesentlichen dem supramolekularen Bauprinzip der

Zellhülle jener Archaeobakterien (Archaeae), die außerhalb der Cytoplasmamembran nur eine S-Schicht als Zellwandkomponente besitzen. Da isolierte S-Schicht (Glyko)Proteine von Archaeobakterien aber wesentlich schwerer an Lipidfilme zur Rekristallisation gebracht werden können, werden vorzugsweise S-Schicht (Glyko)Proteine von anderen prokaryontischen Organismen (z.B. Bacillaceae) verwendet. Die hergestellten kompositen S-Schicht Lipidfilme sind somit biomimetische Strukturen, die den Archaeobakterien Zellgrenzflächen (cell envelopes) nachempfunden sind, u.zw. ohne notwendigerweise die nativen Bausteine der Archaeobakterien verwenden zu müssen.

Aus Arbeiten und Veröffentlichungen der Anmelder ist bekannt, daß bei Gram-positiven Bakterien die S-Schicht (Glyko)Proteine an die darunterliegende rigide Zellwandschicht (die sogenannte peptidoglykanhaltige Schicht) über sehr spezifische Wechselwirkung gebunden sein können. Diese spezifische Bindung erfolgt offensichtlich häufig zwischen dem S-Schicht Protein und den sogenannten sekundären Zellwandpolysmeren (in der Folge SCWP). Letztere sind kovalent an die Matrix der Peptidoglykanschicht gebunden und können von dieser (z.B. durch eine Behandlung mit HF) abgespalten und in reiner Form gewonnen werden. Aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener S-Schicht Proteine wurden Domänen eruiert, die für die Bindung der S-Schicht an die peptidoglykanhaltige Zellwandschicht, insbesondere die SCWP-Komponente, verantwortlich sind.

Wie aus Pum, D. and U.B. Sleytr. 1999. The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. Trends Biotechnol. 17: 8-12. und Sleytr, U.B. and M. Sára. 1997. Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. Trends Biotechnol. 15: 20-26. bereits bekannt wirkt die S-Schicht stabilisierend auf Lipidmembranen doch betreffen diese Veröffentlichungen Verfahren, bei denen die S-Schicht Proteine in Trögen aus der Subphase an gespreitete Lipidfilme oder an Black-Lipid Membranen rekristallisiert wurden.

Das Prinzip SUM-unterstützter Lipidmembranen könnte auch zu völlig neuen Anwendungsmöglichkeiten für funktionelle Lipidmembranen führen. Es ist wesentlich einfacher, einen Lipidfilm auf eine SUM aufzuziehen (z.B. mit Langmuir Blodgett- oder Langmuir Schäfer-Technik) oder direkt auf dieser zu assemblieren, als zunächst den Lipidfilm durch Spreitung auf einen Trog herzustellen und dann die S-Schicht Proteine aus der Subphase an den Lipidfilm zu rekristallisieren. Die Verwendung von SUMs würde auch die Entwicklung neuer Testmethoden nach dem Prinzip der Voltage-Clamp Meßtechnik

ermöglichen, wie sie etwa beim Screening pharmazeutischer Substanzen auf ihre Wirkung auf membranintegrierte oder -assoziierte Moleküle (z.B. Ionenkanäle, Signalübertragungsmoleküle) benötigt werden.

Weiters ist auch die Voltage-Clamp Technik bekannt, bei welcher eine fein ausgezogene, mit Pufferlösung gefüllte Pipette mit großer Vorsicht einer (funktionellen) Lipidmembran gerade soweit genähert, daß ein meßbarer Kontakt entsteht. In der Folge werden die Transmembranenfunktionen elektrophysiologisch bestimmt (z.B. Messung der Transmembranströme). Diese weit etablierte Methodik läßt sich jedoch nicht für Paralleluntersuchungen, wie sie für das High-Throughput-Screening (Testung von vielen Substanzen in einem Arbeitsschritt) erforderlich sind, anwenden.

Stand des Wissens sind somit Methoden zur Herstellung kompositer S-Schicht-Lipidfilme, wobei die S-Schicht (Glyko)Proteine aus einer Lösung an Lipidfilmen (z.B. Langmuir Filme, Black-Lipid Membranen) in meso- oder makroskopischen Dimensionen zur Rekristallisation gebracht werden.

Der Erfindung liegt unter anderem die Aufgabe zugrunde, neue Wege der Stabilisierung von Lipidfilmen zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß sekundäres Zellwandpolymer zur orientierten monomolekularen Bindung von (funktionellen) Molekülen, vorzugsweise Molekülschichten und/oder zur Anlagerung von funktionellen Molekülen an Molekülen eines Trägers verwendet werden. Dadurch können die spezifischen Wechselwirkungen zwischen einer oder mehrerer Domänen von S-Schicht-Proteinen und sogenannten sekundären Zellwandpolymeren für die Herstellung von supramolekularen Strukturen genutzt werden.

Die Herstellung dieser S-Schicht Membranen ist bereits Gegenstand eines in vielen Staaten erteilten Patentes (s. z.B. europäische Patentschrift 0154620 B1). Im wesentlichen beruht das Verfahren auf der Ablagerung von S-Schicht Fragmenten oder Zellwandfragmenten S-Schicht-tragender Prokaryonten auf porösen Trägern; (vorzugsweise) Mikrofiltrationsmembranen mit offenzelliger, schwammartiger Struktur oder Membranen, die nach der Kernspurtechnik (z.B. Nuclepore-Membranen) hergestellt wurden. Nach der Ablagerung einer zusammenhängenden S-Schicht Lage (diese kann auch aus mehreren Einzelschichten bestehen), werden die S-Schicht Gitter intra- und intermolekular chemisch vernetzt (vorzugsweise mit Glutaraldehyd). Bei der Verwendung von Glutaraldehyd als chemischer Crosslinker (chemisches Vernetzungsmittel) werden zur Erhöhung der

chemischen Stabilität der S-Schicht Membranen die entstandenen Schiffischen Basen anschließend vorzugsweise mit Borhydrid reduziert. Die so hergestellten S-Schicht Membranen werden aufgrund der molekularen Siebwirkung der S-Schichtgitter als Ultrafiltrationsmembranen eingesetzt. In der Folge wird für diese S-Schicht
5 Ultrafiltrationsmembranen die Abkürzung "SUMs" verwendet.

Durch die Verwendung von SUMs als Träger für funktionelle Lipidmembranen (oder Membranen, die aus anderen filmbildenden, z.B. amphiphilen Molekülen, bestehen), lassen sich im Vergleich zu den oben beschriebenen Verfahren zur Rekristallisation von S-Schichten auf gespreiteten Lipidfilmen wesentliche technologische und
10 anwendungstechnische Vorteile erzielen.

Die Aufbringung oder die Erzeugung von (funktionellen) Lipidfilmen auf SUMs kann in sehr unterschiedlicher Weise erfolgen:

1. Eintauchen und/oder Austauschen der SUMs aus einem auf einen Trog gespreiteten Lipidfilm (z.B. Langmuir Blodgett- oder Langmuir Schäfer-Technik). Während im Falle
15 eines gespreiteten Tetraetherlipidfilmes durch ein einfaches Ein- oder Austauschen bereits eine "funktionelle" Lipidmembran hergestellt werden kann, sind beispielsweise bei Phospholipiden zwei Schritte (Ein- und Austauschvorgänge) erforderlich.

2. Herstellung einer chemisch gebundenen Lipidmonoschicht am S-Schichtgitter, wobei die hydrophoben Teile der amphiphilen Moleküle von der SUM wegstehen. Der
20 zweite Lipidmonofilm wird dann entsprechend der Langmuir Blodgett- oder Langmuir Schäfer-Technik (siehe oben) aufgebracht.

3. In den S-Schichtgittern können entsprechende Funktionalitäten (z.B. Biotinilierung, Cysteinreste, Streptavidinbindungsdomäne) eingebaut werden. Die entsprechenden SUM-Oberflächen können auf diese Weise mit Lipidmolekülen oder
25 anderen amphiphilen Molekülen eine spezifische Wechselwirkung eingehen. Auf diese Weise lassen sich komposite S-Schicht/Lipidmembranen herstellen, bei denen der Lipidfilm entsprechend der repetitive vorkommenden spezifischen Bindungsstellen an die S-Schicht (Glyko)Proteinmatrix der SUM gebunden ist.

4. Nach der Aufbringung des Lipidfilmes auf die SUM kann gegebenenfalls eine
30 kovalente chemische Vernetzung von Kopfgruppen der Lipidfilme (oder der amphiphilen Moleküle) mit der S-Schicht Matrix erfolgen. Diese Vernetzungsreaktion erfolgt vorzugsweise im Zuge einer Permeation des Vernetzungsmittels durch den porösen Träger der SUM (z.B. durch die Mikrofiltrationsmembran).

Vorteilhafterweise kann die Bindung der sekundären Zellwandpolymere über entsprechende Domänen der funktionellen Moleküle, vorzugsweise Molekülschichten und/oder des Trägers erfolgen, wodurch erreicht wird, daß einerseits eine genaue Lokalisierung und andererseits auch eine genaue Ausrichtung der funktionellen Moleküle bzw.

5 Molekülschichten vorliegt. Dabei kann die Bindung der sekundären Zellwandpolymere an Molekülen, vorzugsweise Molekülschichten oder den Molekülen des Trägers über lektinartige Bindungen erfolgen, was ebenfalls eine genaue Auswahl der Domänen bzw. Epitope zur Bindung der Moleküle bzw. Molekülschichten an den Trägern ermöglicht.

Eine bevorzugte erfindungsgemäßen Verwendung besteht darin, daß die sekundären

10 Zellwandpolymere die Bindeglieder zwischen polymeren Trägerstrukturen und funktionellen Molekülen, Molekülgruppen bzw. Molekülschichten sind, wodurch die polymeren Trägerstrukturen direkt mit entsprechenden funktionellen Molekülen bestückt werden können. Dabei können die Trägerstrukturen Mikrofiltrationsmembranen sein. Weiters können die Molekülschichten in Form von monomolekular kristallin geordneten

15 Proteinschichten vorliegen, wodurch aufgrund der kristallinen Struktur der Proteinschicht einerseits entsprechende Filter mit scharfem Cut-Off erzielt werden können und andererseits diese Proteinmoleküle ihrerseits wieder mit funktionellen Molekülen direkt oder indirekt bestückt sein können. Dazu zählt, daß die monomolekular kristallinen geordneten Proteinschichten ihrerseits Träger einer funktionellen Lipidmembran sind, wodurch sehr

20 stabile Kompositstrukturen erzielt werden, die beispielsweise für Hyperfiltrationen u.dgl. einsetzbar sind. Weiters können die monomolekular geordneten kristallinen Proteinschichten an ihren, den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seiten mit je einer oder mehreren gleichen oder verschiedenen funktionellen Domänen versehen sein, wodurch die Proteinschichten als Mittler für eine geordnete Bindung von weiteren Molekülen verwendet

25 sind. Für spezielle Bindungsmöglichkeiten können die monomolekular geordneten Moleküle amphiphilen Charakter haben und aus hydrophoben Ketten sowie hydrophilen sekundären Zellwandpolymeren bestehen. Dadurch kann die Richtung der Anlagerung an eine wässrige oder nichtwässrige Phase gesteuert werden. Weiters können die Moleküle des Trägers monomolekular kristallin geordnete Proteinschichten sein, wobei die sekundären

30 Zellwandpolymere unter Bildung eines zusammengesetzten Verbundkörpers Bindeglieder zu einer funktionellen Lipidschicht bilden. Solcherart werden die Lipidmoleküle entsprechend von den Proteinschichten distanziert, wobei zudem ein fester Halt der Lipidschicht an den Proteinschichten erzielt ist. Dabei können über die funktionellen Lipidschichten zwei

zusammengesetzte Verbundkörper spiegelbildlich aneinander gebunden sein. Dies ermöglicht die Ausbildung von Schichtungen entsprechend dem sogenannten Sandwich-Prinzip. Dabei können die monomolekular kristallin geordneten Proteinschichten aus gleichen oder unterschiedlichen Proteinmolekülen bestehen, was ermöglicht, daß an den
5 Außenseiten der Verbundkörper unterschiedliche Bindungsdomänen, Ladungen, funktionelle Moleküle u.dgl. vorhanden sind, was das Einsatzgebiet stark erweitert.

Schließlich kann die funktionelle Lipidschicht vesikuläre Struktur aufweisen, was der Natur entsprechend angepaßte künstliche Verbundkörper ermöglicht.

Die Erfindung bezieht sich, wie schon angeführt, auch auf einen Verbundkörper aus
10 einem Träger und einer Molekülschicht, welche erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet ist, daß die Moleküle dieser Molekülschicht orientiert monomolekular an dem Träger entsprechend der erfindungsgemäßen Verwendung über sekundäre Zellwandpolymerketten gebunden sind. Dies ermöglicht die Bildung genau strukturierter chemisch und funktionsmäßig genau definierter Verbundkörper.

15 Dabei können die sekundären Zellwandpolymerketten am Träger und/oder den zu bindenden Molekülen über eine lektinartige Bindung verankert sein, wodurch eine den passenden Domänen der Proteinmoleküle entsprechende Bindung erzielt ist. Um einen stabilen Verbundkörper zu erhalten, können auf einer Polymermatrix monomolekular kristallin geordnete Proteinschichten über die sekundären Zellwandpolymere gebunden sein,
20 wobei diese sekundären Zellwandpolymere sowohl der Verankerung als auch der Ausrichtung und/oder der gezielten Verteilung dienen. Es können auch an den monomolekular kristallin geordneten Proteinschichten an der den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seite Lipidfilme oder Vesikel angeordnet sein, wodurch weitere Verwendungsmöglichkeiten gegeben sind. Weiters können an den monomolekular
25 kristallin geordneten Proteinschichten an der den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seite funktionelle Domänen in regelmäßigen Abständen und Anordnungen vorgesehen sein, was eine gezielten Anlagerung von weiteren funktionellen Molekülen an den Proteinschichten ermöglicht.

Um eine verschiedenartige Bindung bzw. Verteilung von funktionellen Molekülen zu
30 erzielen, können die funktionellen Domänen unterschiedlich, jedoch in regelmäßigen Mustern vorgesehen sein.

Weiters können die sekundären Zellwandpolymere von einer monomolekular kristallin geordneten Proteinschicht, die vorzugsweise direkt auf einen Träger aufgebracht

ist, wegragen und eine funktionelle Lipidschicht binden. Damit wird aufgrund der vorzugsweise direkt auf einen Träger aufgetragenen Proteinschicht eine stabile Trägerschicht erhalten, wobei die Lipidschichten frei von Wechselwirkungen zur Proteinschicht an die sekundären Zellwandpolymere gebunden sind. Dabei können zwei derartige Proteinschichten über die funktionelle Lipidschicht spiegelbildlich gegenüberliegend aneinander gebunden sein, wodurch ein stabiler sandwichartig aufgebauter Verbundkörper erzielt ist. Dabei kann die eine Proteinschicht aus anderen Proteinmolekülen bestehen als die andere Proteinschicht, sodaß an den beiden Seiten des Verbundkörpers unterschiedliche Bindungsverhältnisse, Domänen und Funktionen vorliegen können.

In Abwandlung der oben beschriebenen bekannten Voltage-Clamp Technik kann der Verbundkörper die Mündungsöffnung an einem Ende eines Röhrchens überspannend angeordnet sein. Im Vergleich zu den bekannten offenen Pipetten könnte ein solches mit dem erfindungsgemäßen Verbundkörper versehenes Röhrchen (in der Folge SUM-Röhrchen genannt) viel rascher einer gespreiteten funktionellen Lipidmembran genähert werden, ohne den Film zu zerstören. Auf diese Weise ließen sich beispielsweise zahlreiche nebeneinander angeordnete SUM-Röhrchen gleichzeitig für Meßvorgänge an funktionellen Lipidmembranen verwenden. Grundsätzlich könnte an Meßmethoden gedacht werden, bei denen im ersten Schritt sämtliche SUM-Röhrchen mit funktionellen Lipidmembranen beschichtet werden. Dies könnte durch Eintauchen in einen gespreiteten Tetraetherlipidfilm erfolgen, in dem, in einem vorangegangenen Schritt, funktionelle Moleküle eingebaut werden. [Schuster, B., D. Pum and U.B. Sleytr. 1998. Voltage clamp studies on S-layer supported tetraether lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta 1369: 51-60]. Im zweiten Schritt würden die SUM-Röhrchen in kleine Gefäße (z.B. ähnlich Mikrotiterplatten) abgesenkt werden, in denen sich verschiedene Substanzen befinden, deren Wirkung auf die membranassoziierten oder -integrierten funktionellen Moleküle geprüft werden soll. Die elektrophysiologischen Messungen würden entsprechend der klassischen Voltage-Clamp Technik erfolgen.

SUMs könnten in Verbindung mit SCWP auch als Träger für funktionelle Lipidmembranen im makroskopischen Bereich dienen. Gegenwärtig gibt es kaum vergleichbare Trägerschichten zur großflächigen Stabilisierung von Lipidmembranen.

Schließlich können die erfindungsgemäßen Verbundkörper als Träger spezieller funktioneller Moleküle für Diagnostika, Drug-Targeting, Drug-Delivery, Kunstviren-Drugscreening, High-Throughput-Screening od.dgl. eingesetzt werden.

Mit der erfindungsgemäßen Verwendung sind auch vesikuläre Strukturen geschaffen werden, z.B. Liposomen bzw. Lipidtropfen (Lipidpartikel), die mit S-Schichten bedeckt sind.

Schließlich kann als Träger auch eine Micelle aus hydrophoben selbstorganisierten Ketten verwendet werden.

5 In der Zeichnung sind schematisch verschiedene Ausführungsformen der Verbundkörper im Schnitt und wesentlich vergrößertem Maßstab gezeichnet.

Fig. 1 zeigt die grundsätzliche Nutzung der S-Schichten Ultrafiltrationsmembranen, wobei in allen Abbildungen folgende Abkürzungen verwendet werden:

MF: Mikrofiltrationsmembran,

10 S-L: S-Schicht (engl. S-Layer),

FL: Funktionelle Lipidmembran, d.h. Lipidmembran mit eingebauter Membranfunktion, insbesondere Transmembranfunktion (z.B. Ionenkanal).

Ein derartiger Aufbau ist bereits Stand der Technik aus den eigenen Arbeiten der Anmelder.

15 Fig. 2 zeigt die chemische Kopplung des SCWP an ein weiteres Polymer und anschließende Mischung dieser Moleküle mit einem für die Herstellung von Mikrofiltrationsmembranen (mit schwammartiger Struktur) üblichen Polymer. Beim Ausfällungsprozeß in wässrigen Lösungen (z.B. nach dem Phaseninversionsverfahren) sollten die hydrophilen SCWP in die wässrige Phase ragen, während die an ihnen (kovalent
20 gebundenen) Polymerketten in der kompakten Polymerstruktur verankert sind.

Grundsätzlich sollte auch an andere Möglichkeiten gedacht werden, um die Oberflächen von Polymerstrukturen (Folien, schwammartige oder andere poröse Strukturen) mit SCWPs zu funktionalisieren. Bei all diesen Verfahren sollten die hydrophilen SCWP-Ketten in ausreichender Dichte von der Oberfläche der Polymerstrukturen wegragen, um
25 einen Kontakt zu den entsprechenden Bindungsdomänen des S-Schicht Proteins zu ermöglichen.

Neben den Verfahren der Polymerisation können auch chemische Kopplungsmethoden angewendet werden. Beispielsweise könnten an einem Ende des SCWP reaktive Gruppen eingebaut werden, die mit Gruppen an der Oberfläche der
30 Polymerstrukturen reagieren können. Umgekehrt könnten auch voraktivierte Gruppen auf der Polymermatrix mit reaktiven Gruppen auf dem SCWP zur Reaktion gebracht werden.

Entsprechend Fig. 3 könnten dann auf den mit SCWP funktionalisierten Polymeroberflächen S-Schichten aus einer Lösung von S-Schicht (Glyko)Protein

rekristallisiert werden. Dieser Vorgang würde zu einer kompletten monomolekularen S-Schicht Bedeckung der Polymeroberfläche führen. Da neben nativen S-Schicht (Glyko)Proteinen auch S-Schicht Fusionsproteine, mit eingebauten spezifischen Funktionen (z.B. Biotin-Bindungsdomäne des Streptavidins, Protein A, Protein G, Antikörper- oder Antigendomänen), für die Rekristallisation verwendet werden können, ließe sich über dieses
5 Verfahren eine sehr einheitliche Funktionalisierung von Polymermatrices erreichen (siehe Fig. 3).

Bei der Verwendung von S-Schicht Fusionsprotein gemäß Fig. 4 könnten gleichzeitig auch zwei oder mehrere idente, aber unterschiedlich funktionalisierte S-Schicht Proteine
10 zum Einsatz kommen. Dadurch würde sich aufgrund der einheitlichen Proteinbasisstrukturen auf den SCWP ein einheitliches S-Schichtgitter ausbilden, das jedoch in diskreten Abständen (aber mit statistischer Verteilung) unterschiedliche Bindungsstellen (funktionelle Domänen) aufweist.

Fig. 5 zeigt die Verwendung von amphiphilen Molekülen, bestehend aus SCWP und
15 hydrophoben Ketten, die im molekularen Strukturkonzept beispielsweise Glykolipiden entsprechen. Ähnliche Moleküle werden beispielsweise auch in den Plasmamembranen von Archaeobakterien (Archaea) gefunden. Dabei ist insbesondere die Herstellung der glykolipidäquivalenten Moleküle gezeigt.

Fig. 6 zeigt die Verwendung natürlich vorkommender oder vollsynthetische
20 Moleküle, wobei diese aus einem zentralen hydrophoben Teil und zwei hydrophilen Domänen bestehen.

Fig. 7 veranschaulicht die Nutzung der in Fig. 5 und Fig. 6 dargestellten Moleküle zur Herstellung kompositer SUM/Lipidmembranen. Die Verwendung der in Fig. 5 und 6 schematisch dargestellten amphiphile Moleküle ermöglicht eine breite Variation beim
25 Aufbau kompositer SUM/Lipidmembranen. Besonders hervorzuheben ist die grundsätzliche Möglichkeit, zwei verschiedene SCWP zu verwenden, die an verschiedene S-Schicht Proteine binden.

Fig. 8 illustriert die Herstellung von kompositen S-Schicht/funktionellen Lipidmembranen unter Verwendung von SCWP. In Fig. 8 werden folgende Abkürzungen
30 verwendet:

A: S-Schicht Protein Typ A

SCWP-A: Sekundäres Zellwandpolymer, das spezifisch an S-Schicht Proteine des Typs A bindet,

B: S-Schicht Protein Typ B

SCWP-B: Sekundäres Zellwandpolymer, das spezifisch an S-Schicht Proteine des Typs B bindet.

Auf der Mikrofiltrationsmembran wird zunächst eine S-Schicht (z.B. Typ A) aufgetragen. Dieser Prozeß entspricht im wesentlichen dem bereits oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung von SUMs. In der Folge wird auf die SUM eine Monoschicht von amphiphilen Molekülen (geeignet zur Herstellung von funktionellen Lipidmembranen siehe Beispiele) entweder mit Hilfe der Langmuir Schäfer- oder Langmuir Blodgett Technik aufgezogen. Die Anbindung der Monoschicht an die SUM erfolgt durch eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem SCWP-Teil der amphiphilen Moleküle und der S-Schicht auf der SUM. Diese Verankerung von Lipidmonoschichten an S-Schichten auf SUMs führte zu einer wesentlichen Erhöhung der Stabilität und Lebensdauer funktioneller Lipidmembranen.

Alternativ zu den in Fig. 5 dargestellten Molekülen können auch die in Fig. 6 angeführten Moleküle zur Herstellung der funktionellen Lipidmembran eingesetzt werden, wobei letztere die Herstellung einer funktionellen Lipidmembran in einem Schritt ermöglichen. Bei Verwendung der in Fig. 5 schematisch dargestellten Moleküle muß hingegen in einem zweiten Schritt eine weitere Monoschicht von amphiphilen Molekülen aufgezogen werden. Enthält diese äußere Schicht amphiphile Moleküle mit einem SCWP-Teil, können die exponierten SCWP-Ketten als spezifische Bindungsstellen für eine weitere S-Schicht dienen. Diese zweite S-Schicht kann beispielsweise auf der Lipidmembran aus einer Lösung von S-Schicht (Glyko)Proteinen rekristallisiert werden. Alternativ dazu kann die S-Schicht auch in einem ersten Schritt auf der Wasser-/Luftgrenze rekristallisiert werden und erst in der Folge auf die Lipidmembran aufgebracht (z.B. abgesenkt) werden.

Das in Fig. 8 dargestellte supramolekulare Schichtsystem kann unter Verwendung einheitlicher oder verschiedener SCWP-S-Schicht Partner erfolgen. In der Figur sind Beispiele für S-Schicht Typ A und SCWP Typ A sowie S-Schicht Typ A und SCWP Typ A mit S-Schicht Typ B und SCWP Typ B dargestellt.

Vielfach wird zur Ablagerung von Lipidmembranen auf Trägern die sogenannte Liposomenfusionstechnik eingesetzt. Dabei wird die Lipidmembran in Form von Lipidvesikel (sogenannte Liposomen) angeboten. In den Liposomen sind vorzugsweise auch bereits die gewünschten funktionellen Moleküle eingebaut. Unter entsprechenden

Versuchsbedingungen öffnen sich die Lipidvesikel bei Kontakt mit der Oberfläche des festen Trägers, um schließlich einen zusammenhängenden Lipidfilm auszubilden.

Das SCWP-System kann gegebenenfalls entsprechend Fig. 9 auch dazu verwendet werden, diese Vesikelfusion zu beschleunigen und die Bindung des Lipidfilmes an die SUM zu festigen.

Nutzung von SUM-unterstützten (stabilisierten) funktionellen Lipidmembranen für das High Throughput Screening

Grundsätzlich bieten sich für die Nutzung zwei Meßaufbauten an:

a) Voltage Clamp- oder Patch Clamp Methoden

b) Black Lipid Membrane Methoden

Die Verwendung von SUMs soll in beiden Fällen die Lebenszeit und damit die Verwendbarkeit von funktionellen Lipidmembranen verlängern.

Herstellung von SUM-Röhrchen

Entsprechend Fig. 10 soll die SUM am Ende eines Glas- oder Kunststoffröhrchens so montiert werden, daß eine SUM-überspannte Apertur entsteht. Dieser Teil würde im Prinzip der Öffnung einer Patch Clamp- oder Voltage Clamp Pipette entsprechen; mit dem Unterschied, daß die (funktionelle) Lipidmembran nicht die Pipettenöffnung freitragend überspannt, sondern durch die SUM unterstützt wird. Das Aufbringen der Lipidmembran und ihre Funktionalisierung könnte nach den verschiedenen bereits oben beschriebenen Methoden erfolgen.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von SUM-Röhrchen wird darin gesehen, daß nach der Aufbringung der Lipidmembran eine weitere S-Schicht durch Ablagerung oder Rekristallisation (siehe Fig. 7 und Fig. 8) aufgebracht werden könnte. Diese zusätzliche S-Schicht würde sowohl eine (weitere) Stabilisierungs- als auch Schutzfunktion erfüllen. In diesem Zusammenhang wird an die scharfe molekulare Trenngrenze der S-Schichten erinnert.

Nach der Aufbringung der Lipidmembran auf die SUM bzw. vor oder nach einer eventuellen Rekristallisation einer weiteren S-Schicht kann eine inter- und/oder intramolekulare chemische Vernetzung der S-Schicht (Glykoprotein) Matrix und des Lipidfilmes erfolgen. Dazu müßten entsprechende Crosslinker in die wässrige Phase eingebracht werden.

Die SUM-Röhrchen können entweder einzeln oder in Gruppenanordnungen (siehe Fig. 11) verwendet werden. Eine Anordnung in Gruppen ermöglicht die Aufbringung der

Lipidmembranen in einem Arbeitsschritt und in der Folge Parallelmessungen in einer beliebigen Vielzahl von Gefäßen, in denen sich unterschiedliche Substanzen befinden, deren Wirkung auf die funktionalisierten Membranen geprüft werden soll. Bei der Verwendung von SUM-Röhrchen könnten auch direkt in die mit Pufferlösungen oder H₂O gefüllten Glasröhrchen Wirksubstanzen zugesetzt werden. Weiters könnten, so erforderlich, die Milieubedingungen (z.B Ionenstärke, Ionenzusammensetzung, pH-Wert, Temperatur) in den Röhrchen und getrennt davon in den Gefäßen, in die sie eintauchen, verändert werden, ohne durch eventuell auftretende Druckschwankungen die Integrität des funktionellen Lipidfilmes zu beeinträchtigen. Gerade diese eingangs bereits erwähnte erhöhte Stabilität der SUM-assozierten Lipidmembranen gegenüber Druckveränderungen ist beim erfindungsgemäßen Einsatz besonders nennenswert. Die oben angeführten Vorteile lassen sich auch direkt auf die Meßanordnungen der Black Lipid Membranen übertragen.

Bei Konjugaten aus einem SCWP-(Kohlenhydrat-)Anteil und einem funktionellen Molekülteil kann der Kohlenhydratanteil aus einem intakten SCWP, aus durch chemischen Abbau aus SCWP hergestellten Partialstrukturen (Oligosaccharidfragmente) oder aus synthetisch hergestellten Partialstrukturen der Scwp (Oligosaccharid-Derivaten) bestehen.

Der funktionelle Molekülteil kann dabei als Funktion eine Bindung an Lipidphasen (z.B.Liposomen) oder Gold, eine feste Verankerung an einer Festphase, z.B. S.-Schicht), oder eine Polymerisierbarkeit (das gebildete Konjugat wirkt als Ko-Monomer), weiters eine pharmazeutische Wirkung, ferner eine kombinierte Funktion, wie Bindung an Lipidphasen und immunstimulierende Wirkung (Lipid-A-Derivate, Lipopeptide vom Typ FK-565) oder schließlich eine Detektierbarkeit (z.B. Fluoreszenz) haben.

Chemisch kann die Verknüpfung von Kohlenhydratanteil und funktionellem Anteil auf verschiedene Weise erfolgen, nämlich durch

reduktive Aminierung (Bildung von Schiff'schen Basen mit nachfolgender Reduktion zu sekundären Aminen,
Thiohanstoffbildung oder
Amidbildung.

Die reduktive Aminierung kann an der Carbonylkomponente am Kohlenhydratteil durch Abspaltung des reduzierenden Phosphorsäurerestes vom SCWP unter Bildung von reduzierendem SCWP, durch partielle De-N-Acetylierung und Desaminierung mit salpetriger Säure unter Bildung von Anhydromannose (Anhydroglucose?)-Endgruppen, durch β -Eliminierung von Uronsäure-hältigem SCWP, oder durch Spaltung mit Perjodat

(eventuell partielle Spaltung) erfolgen. An der Aminokomponente am funktionellen Teil kann die reduktive Aminierung durch Phosphatidylethanolamin, durch Ethylendiamin, Propoylendiamin bzw. Einführung einer Aminogruppe am reduzierenden Ende des SCWP, durch Allylamin, Aminomethacrylsäure und deren Derivate, andere Aminoverbindungen mit ungesättigten Gruppen (Aldrich-Katalog) oder S-layers (ϵ -Lysin-NH₂-Gruppen) vorgenommen werden. Aminogruppen am Kohlenhydratteil können durch Reaktion einer Carbonyl-Komponente mit Ethylendiamin oder anderen Diaminoverbindungen entstehen. Die Carbonylkomponente an funktionellen Teil kann als Smith-Produkt von S-Schicht oder von Polysacchariden erhalten werden.

Die Thioharnstoffbildung kann mittels FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder durch Umwandlung von primären Aminen in Isothiocyanate durch Reaktion mit Thiophosgen erfolgen.

Die Amidbildung kann an dem Carbonsäureanteil am Kohlenhydrat (SCWP) mittels Bromoxidation Lactal-Lacton, an der Aminokomponente analog der reduktiven Aminierung, an der Aminokomponente am Kohlenhydrat (SCWP) durch Bildung durch Reaktion einer Carbonylkomponente mit Ethylendiamin oder einer anderen Diaminoverbindung, und am Carbonsäureteil am funktionellen Molekül als Aktivester von langkettigen Fettsäuren und verzweigten Fettsäuren, als Aktivester von Spargelsäure, oder Liponsäure, sowie als Aktivester von Methacrylsäure(derivaten) und anderen ungesättigten Carbonsäuren erfolgen.

BEISPIELE:

Gruppe 1: Modifikation der sekundären Zellwandpolymere

Die sekundären Zellwandpolymere (SCWP) wurden aus peptidoglykanhaltigen Sacculi von verschiedenen Bacillaceae unter Verwendung von 48 % iger Flußsäure (HF) nach der Vorschrift von Ries et al. (1997) extrahiert, mittels Gelchromatographie gereinigt, die Eluate gegen A. purif. dialysiert, die Innendialysate bei -20°C eingefroren und lyophilisiert. Die verwendeten Organismen, deren S-Schicht-Proteine und SCWP haben folgende Bezeichnung: *Bacillus stearothermophilus* PV72/p6 (Sára et al., 1996), SbsA (Kuen et al., 1994), Typ A SCWP (Egelseer et al., 1998); *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (Egelseer et al., 1996), SbsC (Jarosch et al., 2000), Typ A SCWP (Egelseer et al., 1998); *B. stearothermophilus* PV72/p2 (Sára et al., 1996), SbsB (Kuen et al., 1997), Typ B SCWP (Ries et al., 1997; Sára et al., 1998); *B. sphaericus* CCM 2177 (Sára et al., 1989), SbpA, Typ C SCWP (Ilk et al., 1999); *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69

(Sára et al., 1988); SttA, Typ D SCWP. Eine genaue Auflistung der Eigenschaften der einzelnen S-Schicht-Proteine und der entsprechenden SCWP findet sich in der folgenden Tabelle 1.

TABELLE 1

Organismus	1. S-Schicht-Protein 2. Gittertyp 3. Gesamtlänge 4. Signalpeptid	GenBank Accession Number	SCWP	Hauptkomponenten des SCWP / maximales MG	Interaktion des SCWP mit dem
<i>B. stearothermophilus</i> PV72/p6	SbsA hexagonal 1 228 30	X 71092	Typ A	Glukose : N-Acetylglukosamin : 2,3-Dideoxy-2,3-Diacetamidomannuronsäure = 1 : 1 : 2; Struktur aufgeklärt (MG _{max} 50,000)	N-Terminus (AS 31-257) keine SLH-Motife
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 12980	SbsC schräg 1 099 30	AF055578	Typ A	ident wie oben	N-Terminus (AS 31-257) keine SLH-Motife
<i>B. stearothermophilus</i> Mut 1	SbsD schräg 940 30	AF228338	Typ A	ident wie oben	N-Terminus (AS 31-257) keine SLH-Motife
<i>B. stearothermophilus</i> PV72/p2	SbsB schräg 920 31	X 98095	Typ B	N-Acetylglukosamin : N-Acetylmannosamin = 2 : 1; durch Pyruvatketale negativ geladen, Glycerin und Uronsäuren vorhanden; sehr komplex aufgebaut; Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt (MG _{max} ~ 24,000)	N-Terminus (3 SLH-Motife; AS 33-204)
<i>B. sphaericus</i> CCM 2177	SbpA quadratisch 1 322 30	AF211170	Typ C	N-Acetylglukosamin : N-Acetylmannosamin = 2 : 1, jeder 2. N-Acetylmannosamin rest trägt ein Pyruvatketal; Struktur aufgeklärt (MG _{max} ~ 10,000)	N-Terminus (3 SLH-Motife AS 33-202)
<i>Th. thermohydrosulfuricus</i> L111-69	SttA hexagonal nicht bekannt	keine	Typ D	N-Acetylglukosamin : N-Acetylmannosamin : Mannose = 1 : 0.5 : 1; durch Pyruvatketale negativ geladen;	N-Terminus

				Struktur noch nicht aufgeklärt (MG _{max} ~ 25,000)	
--	--	--	--	---	--

Beispiel 1: Konvertierung der latenten Aldehydgruppe (reduzierendes Ende) der Polymerketten in freie Aminogruppen

Zur Modifikation des reduzierenden Endes (latente Aldehydgruppe) der SCWP vom Typ A, B, C und D wurde folgendermaßen vorgegangen: 10 mg des lyophilisierten Materials wurden in 2 ml gesättigter Carbazolhydrazidlösung (pH 6.2) gelöst. Anschließend wurden 200 µl Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN; 20 mg / ml A. purif.) zugefügt, 15 Minuten bei 100°C, dann 16 h bei 90°C inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen Reagentien wurde 24 h gegen A. purif. dialysiert, die Proben bei -20°C eingefroren und lyophilisiert. Zur Bestimmung der freien Aminogruppen wurden 1 mg des jeweiligen SCWP in 2 ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7.8) gelöst, und 100 µl einer Lösung von Butyloxycarbonyl-L-Leucin-N-Hydroxysuccinimidester (BOC-Leuse; 3.5 mg / ml 100 % igem Ethanol) zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 18 h bei 20°C gerührt, dann 6 h gegen eine Mischung aus Ethanol – A. purif. (30 : 70 / v : v) und anschließend gegen A. purif. dialysiert. Das Innendialysat wurde in der Folge lyophilisiert und 0.5 mg des lyophilisierten Materials mit 6 N HCl 6 h bei 110°C für die Aminosäure- und Aminosäureanalyse (Aminosäureanalysator Biotronik; Maintal, D) hydrolysiert. Aus dem Verhältnis von Glukosamin zu Leucin konnte der Modifikationsgrad der Polymerketten bestimmt werden, der für alle SCWPs > 95 % war.

Beispiel 2: Konvertierung der in die SCWP eingeführten Aminogruppen in Thiolgruppen

Zur Konvertierung der in die SCWP eingeführten Aminogruppen wurden 5 mg der nach Beispiel 1 modifizierten SCWP in 5 ml 0.25 M Triethanolamin-HCl-Puffer (pH 8.5) gelöst. Nach Zugabe von 4 mg 2-Iminothiolan (4-Mercaptobutyrimidat) wurde die Lösung 2 h bei 37°C unter Stickstoff-Atmosphäre inkubiert, und anschließend zur Entfernung der Reagentien 18 h gegen entgastetes A. purif. bei 4°C dialysiert. Das Innendialysat wurde in der Folge eingefroren und lyophilisiert. Die Anzahl der eingeführten Thiolgruppen wurde nach der Methode von Ellman (1959) bestimmt. Es zeigte sich, daß die Aminogruppen quantitativ in Thiolgruppen konvertiert werden konnten.

Beispiel 3: Modifikation der eingeführten Aminogruppen mit Biotin

Zur Modifikation der freien Aminogruppen (siehe Beispiel 1) wurde 5 mg lyophilisiertes SCWP vom Typ A, B, C oder D in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7.8) gelöst und 0.5 mg Sulfo-NHS-Biotin (Sigma) zugegeben. Die Modifikation erfolgte nach der von der Firma Pierce empfohlenen Vorschrift. Um überschüssige Reagentien zu entfernen, wurde 18 h bei 4°C gegen A. purif. dialysiert, das Innendialysat bei -20°C eingefroren und lyophilisiert.

Beispiel 4: Aktivierung der eingeführten freien Aminogruppen

Zur Aktivierung der eingeführten Aminogruppen wurden 5 mg der Lyophilisate aus Beispiel 1 in 500 µl einer Lösung aus p-Phenylendiamin (10 mg / ml A. purif.) aufgelöst. In der Folge wurden 100 µl NaBH₃CN-Lösung (20 mg / ml A. purif.) zudosiert, 15 min bei 100°C, dann 16 h bei 90°C inkubiert. Die Reagentien wurden anschließend durch Dialyse (18 h, 4°C) gegen A. purif. oder wahlweise durch Reinigung über eine Superdex S75-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 0.1 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7.8) als Laufmittel entfernt. Die Diazotierung der in die SCWPs eingeführten Aminogruppen erfolgte mit NaNO₂ / HCl nach der von Manjon (1985) beschriebenen Methode. Zur Diazotierung wurden 5 mg mit p-Phenylendiamin modifiziertes SCWP in 35 µl einer vorgekühlten Mischung aus 2 Teilen einer NaNO₂-Lösung (4 % in A. purif.) und 5 Teilen 2 N HCl 1 h bei 4°C gerührt. Überschüssiges Reagens wurde durch Dialyse gegen A. purif. (4 h, 4°C) entfernt, und die Lösung mit dem diazotierten SCWP sofort mit den Substanzen, die freie Aminogruppen enthielten, in Kontakt gebracht.

Beispiel 5: Nachweis der biologischen Aktivität der HF-extrahierten, nativen und chemisch modifizierten SCWP

Zum Nachweis der spezifischen Bindung zwischen den in der Einführung genannten S-Schicht-Proteinen und den verschiedenen Typen von SCWPs wurde die „Surface Plasmon Resonance Technique“ (SPR) angewendet (Gerät: Biacore 2000, Biacore, Uppsala, Schweden). Die S-Schicht-Proteine wurden in wasserlöslicher Form als nicht assemblierte Monomere und / oder Oligomere in einer Konzentration von 100 µg / ml A. purif. auf voraktivierten Carboxy-Dextran-Gold-Chips immobilisiert. Die Resonanz-Units ergaben, daß die Oberfläche der Chips zu etwa 70 % mit S-Schicht-Protein bedeckt war, wobei aufgrund der angewendeten Methode eine Immobilisierung der Subeinheiten in statistischer Orientierung erfolgte. Beispielhaft werden die Untersuchungen mit dem S-Schicht-Protein SbsB von *B. stearothermophilus* PV72/p2, dem rekombinant in *Escherichia coli*

hergestellten S-Schicht-Protein (r SbsB₃₂₋₉₂₀; entspricht dem reifen SbsB des Wildtypstammes), und einer N-terminal verkürzten Form (r SbsB₂₀₈₋₉₂₀; es fehlen die drei SLH-Motife) dargestellt. Aufgrund der Adsorptionskurven zeigte sich, daß auf Chips immobilisiertes

5 SbsB und r SbsB das Typ B SCWP (Konzentrationsbereich 1 – 100 µg / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) spezifisch erkennen;

r SbsB₂₅₈₋₉₂₀ (= Δ 3 SLH-Motife) keine Affinität zum Typ B SCWP besitzt;

SbsB und r SbsB₃₂₋₉₂₀ zu Typ B SCWP, das nach Beispiel 1 bis 4 modifiziert worden war, eine vergleichbare Affinität wie zu nativen Typ B SCWP hatten;

10 SbsB und r SbsB₃₂₋₉₂₀ HF-extrahiertes, mit Lysozym verdautes Peptidoglykan nicht binden.

Vergleichende Versuche wurden auch mit den S-Schicht-Proteinen SbsA, SbsC und r SbsC₃₁₋₁₀₉₉ und dem Typ A SCWP, sowie mit SbpA, r SbpA und dem Typ C SCWP und SttA und dem Typ D SCWP durchgeführt. In allen Fällen konnte der eindeutige Nachweis
15 der spezifischen Bindung zwischen dem jeweiligen S-Schicht-Protein und dem dazugehörigen SCWP erbracht werden.

Beispiele der Gruppe 2: Bindung der modifizierten SCWPs an Moleküle eines festen Trägers zur orientierten monomolekularen Bindung von S-Schicht-Proteinen

Beispiel 6: Verwendung von Mikrofiltrationsmembranen (MF) als festen Träger

20 Als Träger wurde eine MF (Pall Carboxydyne) mit einer durchschnittlichen Porengröße von 0.4 µm und einem Durchmesser von 14 mm verwendet. Zur Aktivierung der freien Carboxylgruppen wurde die MF in eine Lösung aus EDC (10 mg / ml A. puif., pH 4.7) 1 h bei 20°C gelegt, und anschließend dreimal mit eiskaltem A. purif. gewaschen. Zur kovalenten Bindung des Typ C SCWP wurden 5 mg des unter Beispiel 1 beschriebenen
25 modifizierten Materiales in 5 ml A. purif. gelöst, wobei der pH Wert der Lösung mit 0.01 N NaOH auf 9.0 eingestellt wurde. Nach 4 h Inkubation bei 20°C wurde die MF entnommen und mit 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) fünfmal gewaschen. Anschließend wurde die MF in eine Lösung von SpbA-Protein (100 µg / ml 10 mM CaCl₂ – Lösung) gelegt und 6 h bei
30 20°C inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem S-Schicht-Protein wurde die MF fünfmal mit 10 ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gewaschen und in 1mm² große Stückchen zerschnitten, die mit 100 µl einer SDS-Lösung (Natrium-Dodecylsulfat; 10 % in A. purif.) 10 min bei 100°C extrahiert wurden. In der Folge werden 25 µl des klaren Extraktes mit 75 µl Sample Solution (Laemmli, 1971) gemischt, und 1- 10 µl dieser

Mischung auf SDS-Gele (10 % ige Trenngele) aufgetragen. Aufgrund der Stärke der Proteinbanden der Probe (Molekulargewicht von SpbA auf SDS-Gelen 127,000) und dem Vergleich mit entsprechenden SpbA-Standards konnte die Menge an gebundenem S-Schicht-Protein auf 80 - 100 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ MF geschätzt werden, was der vom Hersteller angegebenen maximalen Bindungskapazität dieser hochporösen MF für Proteine entspricht.

Beispiel 7: Verwendung eines Siliziumoxid-Wafers (SOW) als festen Träger

SOW mit einer Größe von 3 x 5 mm wurden in 500 μl einer Lösung von Aminosilan (5 % in A. purif., pH 3.5) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit A. purif. und Ethanol, wurden die silanisierten SOW 15 min 110°C getrocknet, schließlich in einer Lösung von m-Maleimidbenzoylsulfosuccinimidester (Sulfo-MBS, Pierce; 150 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.0) 2 h bei 37°C voraktiviert, und mit A. purif. gewaschen. Zur Bindung von modifiziertem Typ B SCWP (wie in Beispiel 2 beschrieben) wurde 1 mg des Lyophilisates / ml 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.0) gelöst, und 500 μl auf den SOW aufgebracht. Nach 2 h Inkubation bei 20°C unter N_2 -Atmosphäre wurden die Plättchen mit 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer und A. purif. gewaschen, zur orientierten Bindung entweder SbsB oder r SbsB (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) angeboten, und der mit Typ B SCWP funktionalisierte SOW 4 h bei 20°C in dieser Lösung inkubiert. Durch Waschen mit TRIS-HCl-Puffer wurde überschüssiges S-Schicht-Protein entfernt, der SOW im AFM untersucht und die Orientierung des schrägen S-Schicht-Gitters bestimmt. Es zeigte sich, daß SbsB und r SbsB mit der Innenseite der Subeinheiten (N-terminale Region, die die 3 SLH-Motive trägt) gebunden hatte. Aus zahlreichen Untersuchungen an SOWs ist bekannt, daß SbsB in Abwesenheit des Typ B SCWP mit der Außenseite bindet (Neubauer et al., 2000). Demnach erfolgte die orientierte Bindung der S-Schicht-Subeinheiten an den SOW über das kovalent an den festen Träger gebundene Typ B SCWP. Anstatt von SbsB kann auch rekombinant hergestelltes SbsB-Streptavidin-Fusionsprotein verwendet werden.

Beispiel 8: Verwendung eines Siliziumoxid-Wafers (SOW) als festen Träger

Zur Einführung von Thiolgruppen wurde ein 3 x 5 mm großer SOW in einer Lösung aus 3-Mercaptosilan (7 % in 50 % igem Aceton) 30 min bei 37°C gelegt. Nach fünfmaligem Waschen mit 50 % igem Aceton wurden der SOW bei 110°C 15 min lang unter N_2 -Atmosphäre getrocknet. Zur Aktivierung der Thiolgruppen wurde 500 μl einer Lösung aus 2-2'-Dipyridyldisulfid (5 mg / ml 10 % igem Ethanol) auf den SOW gebracht. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 20°C. Nach Entnahme des SOW wurde dieser

mehrfach mit 10 % igem Ethanol und A. purif. gewaschen und dann in 500 µl einer Lösung aus Typ A SCWP (3 mg / ml A. purif.; modifiziert wie in Beispiel 2 beschrieben) 6 h bei 20°C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Typ A SCWP wurde der SOW mehrfach mit A. purif. und 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.0) gewaschen. Zur orientierten Bindung wurde der mit Typ A SCWP beladene SOW in eine Lösung aus folgenden S-Schicht-Protein-Formen (100 µg / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) für einen Zeitraum von 8 h gelegt: SbsC (Wildtyp-Protein), r SbsC₃₁₋₁₀₉₉, r SbsC₂₅₈₋₁₀₉₉ und r SbsC₃₄₂₋₁₀₉₉. Den letzten beiden Formen fehlte die für das Typ A SCWP verantwortliche N-terminale Bindungsregion (Jarosch et al., 2000). Der SOW wurde nach der Inkubation mit den verschiedenen S-Schicht-Protein-Formen mit TRIS-HCl-Puffer und A. purif. gewaschen und anschließend im AFM untersucht. Aufgrund des schrägen S-Schicht-Gitters, das durch das S-Schicht-Protein SbsC ausgebildet wird, war eine eindeutige Bestimmung der Bindungsseite möglich. Es zeigte sich, daß die Basisvektoren dieselbe Orientierung wie an intakten Zellen oder Zellwandfragmenten von *B. stearothermophilus* ATCC 12980 hatten. Im Falle der N-terminal verkürzten r SbsC-Formen konnte im AFM keine Gitterstruktur entdeckt werden.

Beispiel 9: Verwendung von MF als feste Träger

Das Typ A SCWP, das wie in Beispiel 1 beschrieben, modifiziert wurde, wurde an mit Carbodiimid-aktivierte MF gebunden (siehe Beispiel 6). Folgende Formen von SbsC wurden in einer Konzentration von 150 µg / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) angeboten, und die Membranscheibchen mit einem Durchmesser von 14 mm 8 h bei 20°C inkubiert: r SbsC₃₁₋₁₀₉₉, r SbsC₂₅₈₋₁₀₉₉, r SbsC₃₄₂₋₁₀₉₉, r SbsC₃₁₋₈₄₄, r SbsC₃₁₋₈₆₀, r SbsC₃₁₋₈₈₀, r SbsC₃₁₋₉₀₀, r SbsC₃₁₋₉₂₀ und SbsC. Nach der Inkubation wurden die MF mit 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gewaschen, in 1 mm² große Teilchen zerschnitten, mit SDS-Lösung extrahiert und mittels SDS-PAGE untersucht (siehe Beispiel 6). Aufgrund der entsprechenden Standardreihen konnte die gebundene Menge an jenen Formen, die den vollständigen N-Terminus trugen, zwischen 80 – 100 µg / cm² MF abgeschätzt werden. Hingegen fand im Falle von r SbsC₂₅₈₋₁₀₉₉ und r SbsC₃₄₂₋₁₀₉₉ keine Bindung an die mit Typ A SCWP funktionalisierte MF statt. Der Einsatz der unterschiedlich verkürzten Formen bestätigte die Ergebnisse der Affinitätsstudien (Egelseer et al., 1998; Jarosch et al., 2000) und der SPR-Messungen, daß ausschließlich der N-terminus für die Interaktion mit dem SCWP verantwortlich ist.

Beispiele der Gruppe 3: Synthese von Glyko-Lipiden (GL) aus SCWPs

Beispiel 10: GLs aus allen Typen von SCWPs

Die lyophilisierten nativen SCWPs wurden in A. purif. gelöst (10 mg / ml A. purif.) und mit einer Lösung aus Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (DPPE ; 20 mg / 400 µl Chloroform : Methanol = 1 : 1) vermischt. Nach Inkubation in verschraubten Reaktionsröhrchen bei 60°C über einen Zeitraum von 4 h wurde der Lösung 4 mg NaBH₃CN hinzugefügt, und die Inkubation 16 h bei 60°C fortgesetzt. Die gebildeten GLs wurden mittels Gelchromatographie (Superdex S75) gereinigt. Das Säuleneluat wurde auf Glukosamin und Phosphat überprüft; jene Fraktionen, die beide Komponenten enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert.

Beispiel 11: GLs aus allen Typen von SCWPs

Anstatt der SCWP mit reduzierendem Ende wurden die nach Beispiel 2 modifizierten SCWPs mit einer freien Thiolgruppe eingesetzt. Als Lipidkomponente wurde DPPE verwendet. Zur Aktivierung der SCWPs wurden jeweils 5 mg in 1 ml 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.0) gelöst, und 1 mg Sulfo-MBS hinzugefügt. Nach Inkubation für 2 h bei 37°C wurde die Reaktionsmischung mit einer Lösung von DPPE (3 mg in 500 µl Chloroform : Methanol = 1: 1 = v : v) vermischt, und der Ansatz 16 h bei 20°C unter Rühren inkubiert. Die Reinigung der GLs erfolgte, wie in Beispiel 10 beschrieben, gelchromatographisch mit Hilfe einer Superdex S75 – Säule.

Beispiele der Gruppe 4: Verwendung der GLs zur Herstellung von Liposomen und zur orientierten Bindung der S-Schicht-Proteine

Beispiel 12: Nachweis des Einbaus von GLs in Liposomen

Liposomen, die DPPC, Cholesterin und GL nach Beispiel 10 oder 11 aus Typ C SCWP in einem molaren Verhältnis von 10 : 5 : 4 enthielten, wurden nach der von Mader et al. (1999) beschriebenen Methode hergestellt und mittels Gelchromatographie von den Ausgangskomponenten gereinigt. Zum Nachweis, ob die hydrophilen Ketten des Typ B SCWP an der Oberfläche der Liposomen exponiert waren, wurde eine Perjodatoxidation, bei der nur vicinale Hydroxylgruppen angegriffen werden, durchgeführt. Die Liposomen, die für die Reaktion eingesetzt wurden, entsprachen einer DPPC-Konzentration von 2 µmol / ml 0.2 M Natrium-Acetat-Puffer (pH 4.5). Dieser Suspension wurde soviel Natriumperjodat zugegeben, daß eine Endkonzentration von 20 mM erreicht wurde. Die Reaktionsmischung wurde 1 Stunde im Dunkeln bei 20°C unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugieren und zweimaligem Waschen der Liposomen mit 0.2 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (pH

8.2) wurden diese in 2 ml einer Lösung aus Ferritin (1 mg / ml 0.2 M Natriumhydrogencarbonat, pH 8.2) 4 h bei 20°C inkubiert. Die Liposomen wurden anschließend mehrmals mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Für Untersuchungen im Transmissions-elektronenmikroskop wurden die Proben sowohl negativkontrastiert, wie auch für Ultradünnschnitte eingebettet. Im negativkontrastierten Präparat zeigte sich, daß die Liposomenoberfläche vollständig mit Ferritin bedeckt war; im Ultradünnschnitt konnte eine Monoschicht von Ferritin an der Liposomenoberfläche nachgewiesen werden. Nach Perjodatoxidation war das Typ B SCWP nicht mehr biologisch aktiv; die freien Aldehydgruppen konnten jedoch zur kovalenten Bindung von Fremdmolekülen mit exponierten Aminogruppen herangezogen werden.

Beispiel 13: Orientierte Rekristallisation des S-Schicht-Proteins SbsB

Die unter Beispiel 12 beschriebenen Liposomen, die das GL aus DPPE und Typ B SCWP enthielten (siehe Beispiel 10), wurden zur orientierten Rekristallisation des S-Schicht-Proteins SbsB eingesetzt. Auf Liposomen, die DPPE und Cholesterol enthielten, bindet SbsB mit der Außenseite, sodaß der N-Terminus mit der Bindungsregion für das Typ B SCWP in das externe Milieu gerichtet ist (Mader et al., 1999). Im Falle der Liposomen, die das GL aus DPPE und Typ B SCWP enthielten, wurden 2 ml einer Suspension mit einem DPPE-Gehalt von insgesamt 4 µmol mit 2 ml einer SbsB-Lösung (1 mg / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) 6 h bei 20°C inkubiert, die Suspension zur Entfernung von überschüssigem S-Schicht-Protein zentrifugiert, die Liposomen mit 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gewaschen, und die Präparate nach einer Gefriertrocknung bei -80°C und Schrägbeschattung mit Pt/C im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Es zeigte sich, daß im Falle der GL-hältigen Liposomen die glatte Außenseite des schrägen S-Schicht-Gitters exponiert war, während bei den DPPE-Cholesterol-Liposomen die raue Innenseite zu erkennen war.

Beispiel 14: Modifikation von DPPC/Cholesterol/HDA-hältigen Liposomen mit SCWP

Liposomen wurden wie von Mader et al. (1999) beschrieben, hergestellt. Das unter Beispiel 2 beschriebene, mit 2-Iminothiolan modifizierte Typ C SCWP wurde zum Funktionalisieren der Liposomenoberfläche verwendet. Aus diesem Grunde wurden die Liposomen, die einer DPPC-Konzentration von 5 µmol entsprachen, in 3 ml 0.2 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7.0) suspendiert, und 2 mg Sulfo-MBS zur Aktivierung der freien Aminogruppen von HDA dazugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 20°C

wurde zentrifugiert, die Liposomen in 2 ml einer Lösung aus Typ C SCWP (1.5 mg / ml Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.0; modifiziert nach Beispiel 2) suspendiert, und 18 h bei 20°C inkubiert. Der Nachweis der Immobilisierung des SCWP erfolgte, wie in Beispiel 12 beschrieben, über Perjodatoxidation und Immobilisierung von Ferritin. Die Rekristallisation
5 des S-Schicht-Proteins SbpA wurde analog der Vorgangsweise in Beispiel 13 durchgeführt. Der Nachweis der orientierten Bindung des SbpA-Proteins erfolgte elektronenmikroskopisch an gefriergetrockneten und mit Pt/C-bedampften Präparaten.

Beispiel 15: Verwendung des r SbsB-Streptavidin-Fusionsproteines

Ein C-terminales rekombinant in *E. coli* hergestelltes SbsB-Streptavidin-
10 Fusionsprotein (4 mg Lyophilisat) wurde in 2 ml 6 M Guanidinhydrochlorid in 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gelöst, 0.8 mg Streptavidin zugegeben, und die Lösung 1 h bei 20°C gegen A. purif. dialysiert. Nach Entnahme des Inedialysates wurde bei 40,000 x g zentrifugiert, und der klare Überstand, der lösliches r SbsB-Strept(4) enthielt, auf eine Proteinkonzentration von 120 µg / ml 0.2 TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) eingestellt. 1 ml der
15 Proteinlösung wurde in der Folge mit 1 ml der Liposomensuspension, die nach Beispiel 13 hergestellt worden war, vermischt, und die Proben 2 h bei 20°C inkubiert. Nach Zentrifugieren wurden die Liposomen zweimal mit 0.2 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) gewaschen, schließlich mit biotiniliertem human IgG inkubiert und die Bindung nach der von Mader et al. (2000) entwickelten Vorschrift überprüft. Eine Bindung von biotiniliertem
20 human IgG war nur aufgrund der an der S-Schicht-Außenseite exponierten Streptavidin-Reste möglich. Die gewünschte Orientierung (Bindung über den an der S-Schicht-Innenseite liegenden N-Terminus) wurde nur für jene Liposomen beobachtet, bei denen das Typ B SCWP kovalent an HDA gebunden worden war.

Beispiele der Gruppe 5: Aufbau von Lipiddoppelschichten

25 Beispiel 16: Lipid-Bilayer mit Kanalprotein mit einem Silizium-Wafer als feste Oberfläche

Auf einem SOW (3 x 5 mm) wurden durch Silanisieren mit Mercaptosilan (siehe Beispiel 8) Thiolgruppen eingeführt, an die mittels Sulfo-MBS als heterobifunktionellen Crosslinker nach Beispiel 1 modifiziertes Typ A SCWP (1 mg / ml 50 mM Kalium-
30 Phosphat-Puffer, pH 7.0) gebunden wurde. Nach gründlichem Waschen des SOW mit Phosphatpuffer und A. purif. wurden 500 µl einer Lösung aus SbsA-Protein (100 µg / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) aufgebracht, 6 h bei 20°C inkubiert, mit Puffer gewaschen und das als Monoschicht vorliegende SbsA-Protein mit Glutaraldehyd (0.5 % in 50 mM

Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.2) 20 min bei 20°C vernetzt. In der Folge wurde ein Bilayer aus DPPE nach der von Schuster et al. (1998) beschriebenen Methode aufgebracht, in dem α -Haemolysin oder Valinomycin inseriert worden waren (Schuster et al., 1998 a,b).

Beispiel 17: Verwendung einer S-Schicht-Ultrafiltrationsmembrane (SUM) als festen

5 Träger

Ein SUM-Scheibchen (Durchmesser 25 mm) wurde in eine Ultrafiltrationszelle eingelegt, sodaß nur die S-Schicht-Außenseite exponiert war. Die freien Carboxylgruppen des S-Schicht-Proteins wurden durch Zugabe einer EDC-Lösung (6 mg / ml A. purif.; pH 4.7) 80 min bei 20°C aktiviert, die Membranoberfläche dreimal mit eiskaltem A. purif. gewaschen, und anschließend 2 ml einer Lösung des nach Beispiel 1 modifizierten Typ A SCWP (1 mg / ml; pH 9.0) zur kovalenten Bindung an der S-Schicht-Außenseite aufgebracht. Nach 5 h Inkubation bei 20°C wurde die SUM dreimal mit 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7.2) und dreimal mit A. purif. gewaschen, und schließlich mit einer Lösung von SbsA-Protein (100 μ g / ml 50 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7.2) 5 h bei 20°C inkubiert. Nach 15 Waschen des Membranscheibchens mit Puffer wurde ein Teil zerkleinert, und zur Untersuchung der gebundenen SbsA-Menge mittels SDS-PAGE mit SDS-Lösung extrahiert. Eine im Parallelverfahren hergestellte SbsA-SCWP-SUM wurde zur Stabilisierung des S-Schicht-Proteins mit Glutaraldehyd (wie in Beispiel 16 beschrieben) vernetzt, und zur Beschichtung mit einem DPPE-Film und integralen Membranproteinen (z. B. α -Hameolysin) verwendet. 20

Beispiel 18: Kovalente Bindung eines GL an die SUM

Verwendung einer SUM und Beschichtung mit dem im Beispiel 10 oder 11 beschriebenen GL aus Typ C SCWP und DPPE. In der Folge wurde die mit Typ C SCWP funktionalisierte SUM mit einer Lösung aus SbpA-Protein (50 μ g / ml 10 mM CaCl_2) 6 h bei 25 20°C inkubiert, und die SUM-Oberfläche mit 10 mM CaCl_2 -Lösung gründlich gewaschen. Zur Überprüfung der orientierten monomolekularen Bindung des SbpA-Proteins wurde die SUM für Untersuchungen im Transmissionselektronenmikroskop sowohl einer Gefriertrocknung unterzogen, wie auch für Ultradünnschnitte verwendet. Es zeigte sich, daß eine geschlossene monomolekulare Schicht mit quadratischem Gitter vorhanden war, wobei 30 die glatte Außenseite des S-Schicht-Gitters exponiert war.

Beispiele der Gruppe 6: Herstellung von SCWP-haltigen Kopolymeren

Beispiel 19: Herstellung eines Kopolymers unter Verwendung von Acrylamid

Eine Lösung, die pro ml A. purif. 20 mg nach Beispiel 1 modifiziertes Typ C SCWP, 6.8 mg Acrylamid und 3 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin enthält, wird 30 min am Wasserstrahlvakuum entgast. Nach Zugabe von Ammonperoxodisulfat (1 mg) wird 18 h bei 4°C reagieren gelassen. Anschließend wird das Produkt über Sephadex G-50 getrennt (2,6 ×
5 100 cm, 0,01 M Natriumhydrogencarbonat), über Biogel P2 entsalzt und lyophilisiert. Der Gehalt an SCWP wird über Aminosucker-Analyse ermittelt.

Beispiel 20: Herstellung eines Kopolymers unter Verwendung von Polyvinylalkohol

Es wird eine Lösung von Polyvinylalkohol (PVA; 3 % in A. purif.) hergestellt und zu
10 1 ml dieser Lösung werden 20 mg natives Typ A SCWP dazugefügt. Anschließend werden 100 µl auf einem gereinigten Objektträger ausgegossen, und zur Stabilisierung des Filmes dieser 30 Minuten bei 37°C getrocknet. Alternativ kann der Film durch Inkubation in einer Lösung aus Glutaraldehyd (0.5 % in 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.2) über einen Zeitraum von 10 Minuten chemisch fixiert werden. Der mit A. purif. gewaschene PVA-
15 SCWP-Film wird als Matrix zur orientierten Rekristallisation des S-Schicht-Proteins SbsC verwendet (siehe Beispiel 8 und 9).

Patentansprüche:

1. Verwendung von sekundärem Zellwandpolymer prokaryontischer Mikroorganismen zur orientierten monomolekularen Bindung von (funktionellen) Molekülschichten und/oder deren Anlagerung an Molekülen eines Trägers.

5 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der sekundären Zellwandpolymere über entsprechende Domänen der funktionellen Molekülschichten und/oder des Trägers erfolgt.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der sekundären Zellwandpolymere an den Molekülschichten und/oder den Molekülen des Trägers über lektinartige Bindungen erfolgt.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die sekundären Zellwandpolymere die Bindeglieder zwischen polymeren Trägerstrukturen und funktionellen Molekülen bzw. Molekülgruppen sind.

5. Verwendung nach 4, dadurch gekennzeichnet, daß die polymeren Trägerstrukturen Mikrofiltrationsmembranen sind.

6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekülschichten zweidimensionale kristalline Proteinschichten sind.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionalen kristallinen Proteinschichten ihrerseits Träger einer funktionellen Lipidmembran sind.

8. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionalen kristallinen Proteinschichten an ihren den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seiten mit je einer oder mehreren gleichen oder verschiedenen funktionellen Domänen versehen sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die monomolekular gebundenen Moleküle hydrophobe Ketten sind und mit den hydrophilen sekundären Zellwandpolymeren amphiphile Moleküle bilden.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Moleküle des Trägers jene von zweidimensionalen kristallinen Proteinschichten sind, wobei die sekundären Zellwandpolymere unter Bildung eines zusammengesetzten Verbundkörpers die Bindeglieder zu einer funktionellen Lipidschicht sind.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß über die funktionelle Lipidschicht zweite zusammengesetzte Verbundkörper spiegelbildlich aneinander gebunden sind.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die kristallinen Proteinschichten aus gleichen oder unterschiedlichen Proteinmolekülen bestehen.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionelle Lipidschicht vesikuläre Struktur aufweisen.

14. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine Micelle aus hydrophoben selbstorganisierten Ketten ist.

15. Verbundkörper aus einem Träger und einer Molekülschicht, dadurch gekennzeichnet, daß die Moleküle dieser Molekülschicht orientiert monomolekular an dem Träger über sekundäre Zellwandpolymerketten gebunden sind.

16. Verbundkörper nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die sekundären Zellwandpolymerketten am Träger und/oder den zu bindenden Molekülen über eine lektinartige Bindung verankert sind.

17. Verbundkörper nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Polymermatrix kristalline Proteinschichten über die sekundären Zellwandpolymere gebunden sind.

18. Verbundkörper nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß an den kristallinen Proteinschichten an der den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seite Lipidfilme oder -vesikel angeordnet sind.

19. Verbundkörper nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß an den kristallinen Proteinschichten an der den sekundären Zellwandpolymeren abgewandten Seite funktionelle Domänen in regelmäßigen Abständen und Anordnungen vorgesehen sind.

20. Verbundkörper nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Domänen unterschiedlich, jedoch in regelmäßigen Mustern vorgesehen sind.

21. Verbundkörper nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die sekundären Zellwandpolymere von einer kristallinen Proteinschicht, die vorzugsweise direkt auf einen Träger aufgebracht ist, wegragen und eine funktionelle Lipidschicht binden.

22. Verbundkörper nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß zwei derartige Proteinschichten über die funktionelle Lipidschicht spiegelbildlich gegenüberliegend aneinander gebunden sind.

23. Verbundkörper nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die eine Proteinschicht aus anderen Proteinmolekülen besteht als die andere Proteinschicht.

24. Verbundkörper nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er die Mündungsöffnung an einem Ende eines Röhrchens überspannend angeordnet ist.

5 25. Verbundkörper nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine Micelle aus hydrophoben, selbstorganisierten Ketten ist

26. Verwendung eines Verbundkörpers nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Träger spezieller funktioneller Moleküle für Diagnostika, Drug-Screening, High Throughputscreening od.dgl. eingesetzt werden.

10 27. Verwendung eines Verbundkörpers nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur spezifischen Bindung von Zellen, vorzugsweise in Monoschichten, eingesetzt werden, wobei gegebenenfalls das SCWP an der Oberfläche der Zellen exponiert ist.

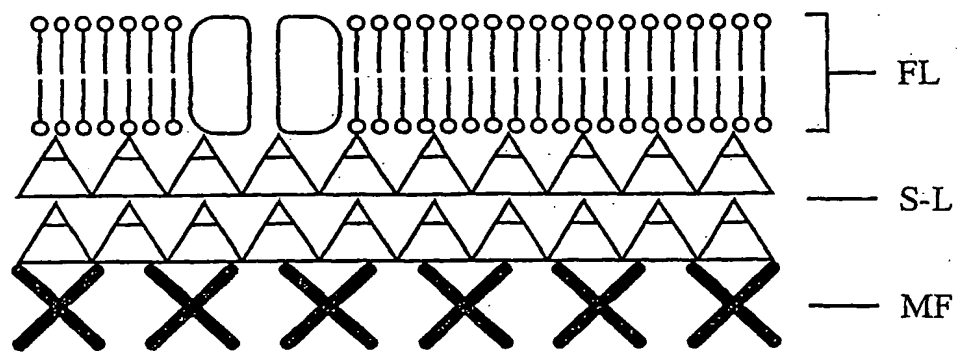


Fig.1

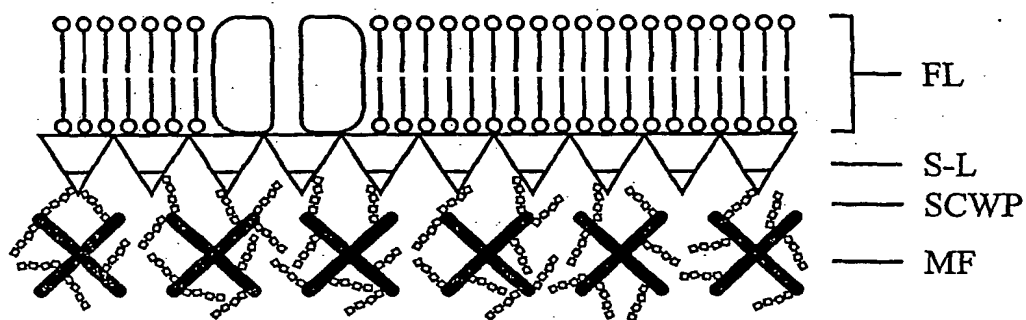


Fig.2

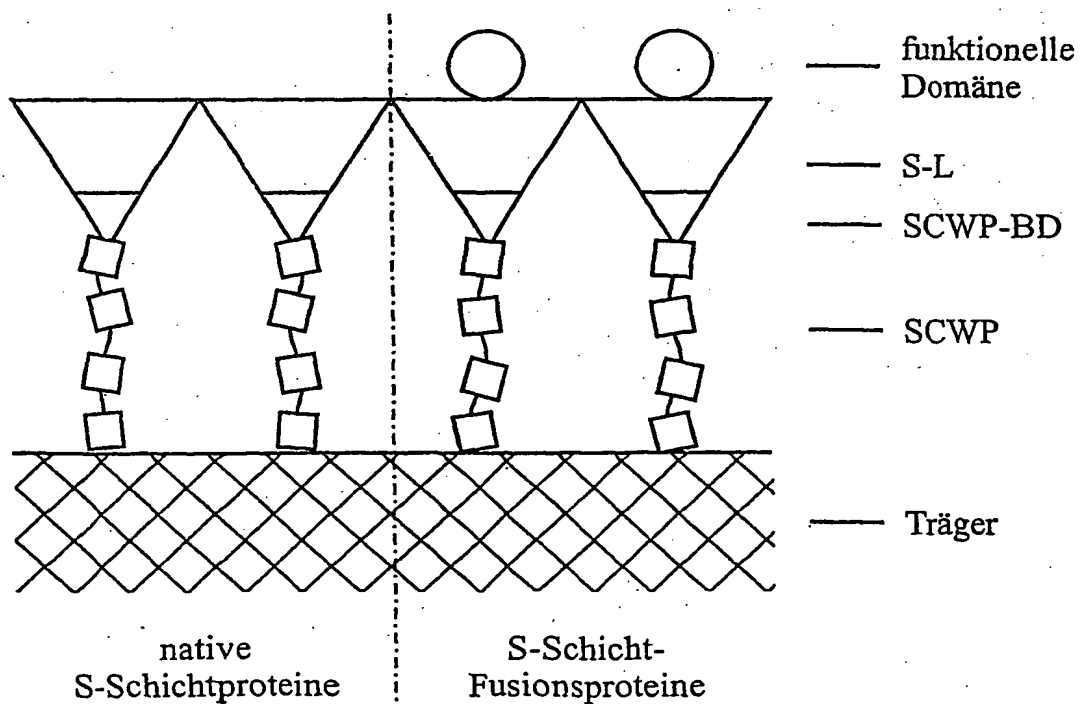


Fig.3

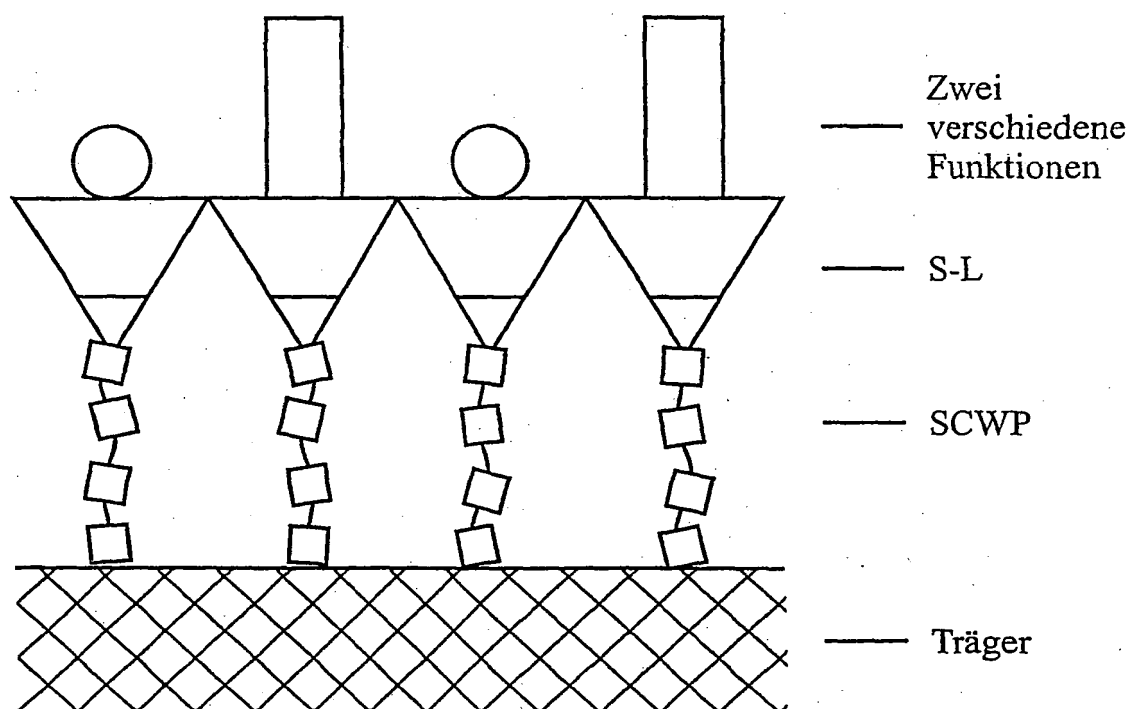


Fig.4

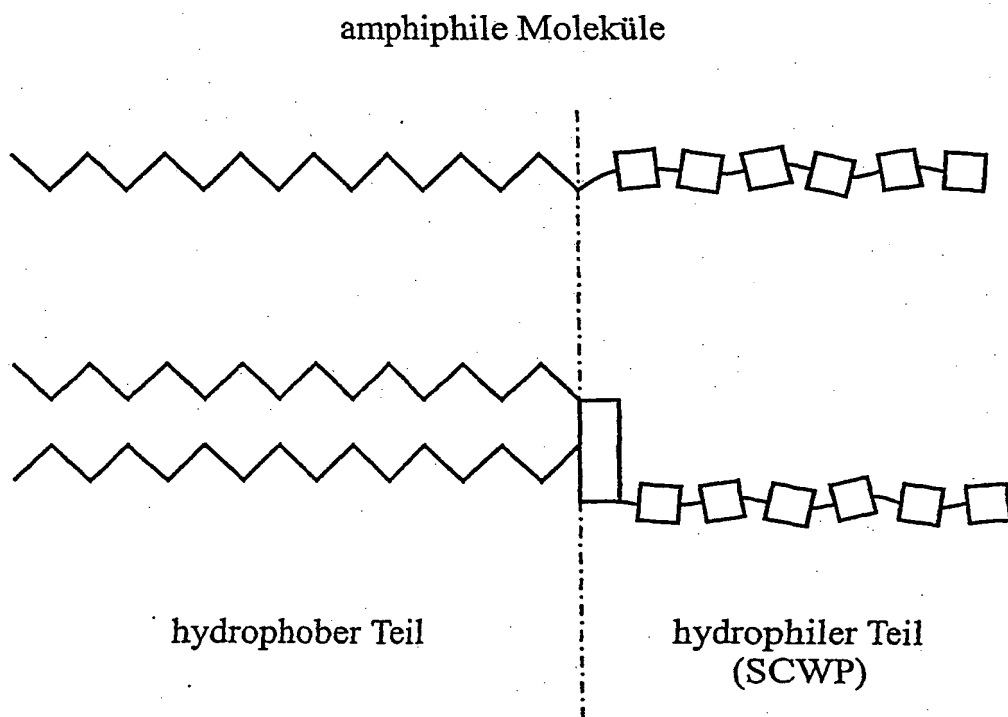


Fig.5

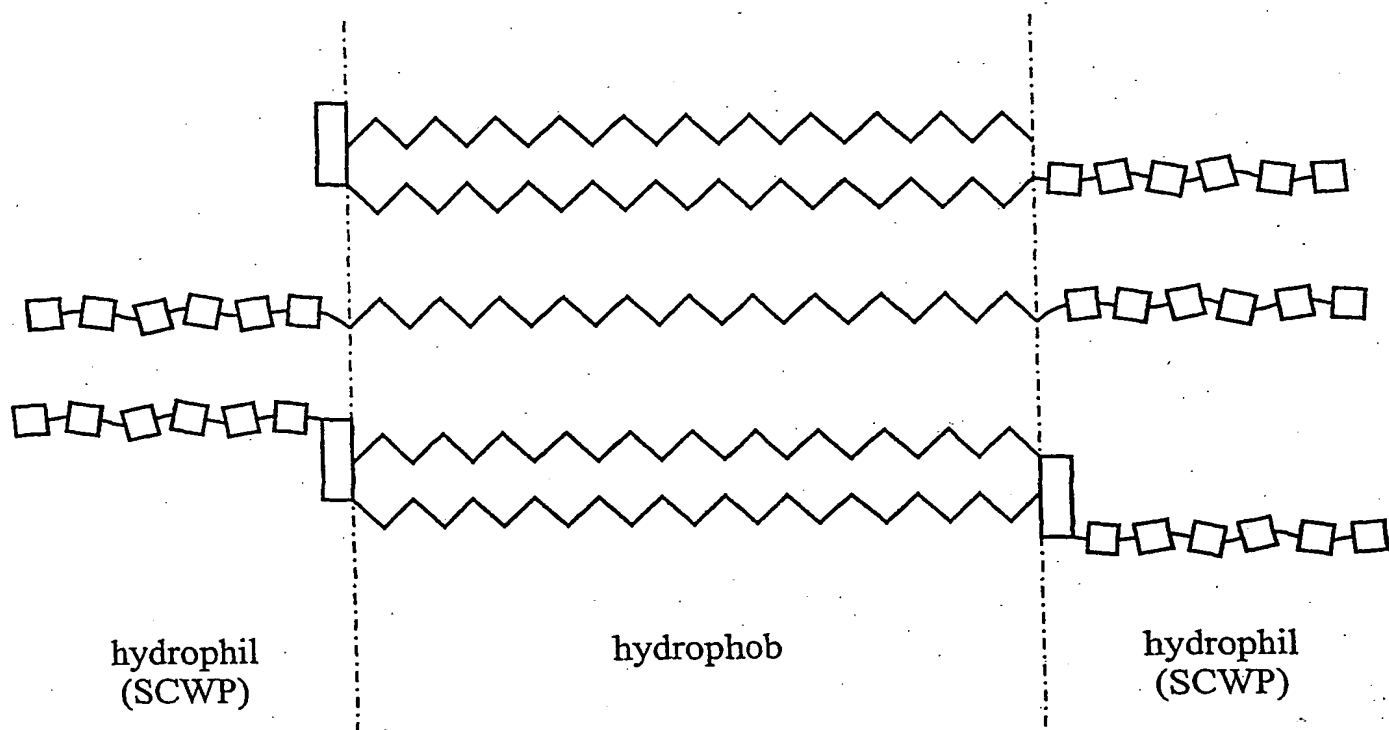


Fig.6

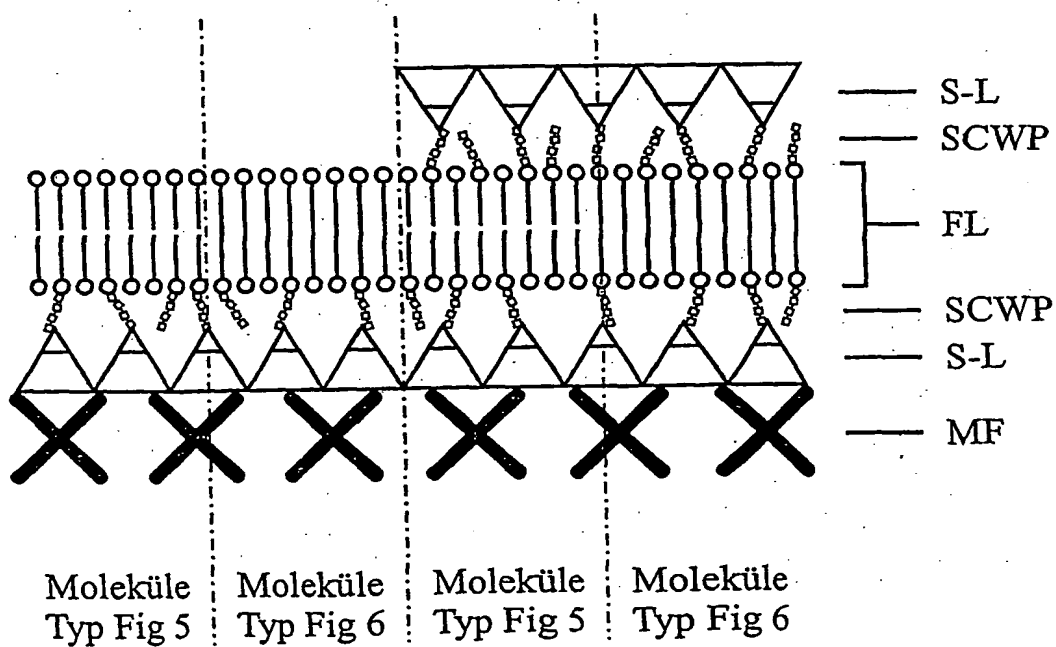


Fig.7

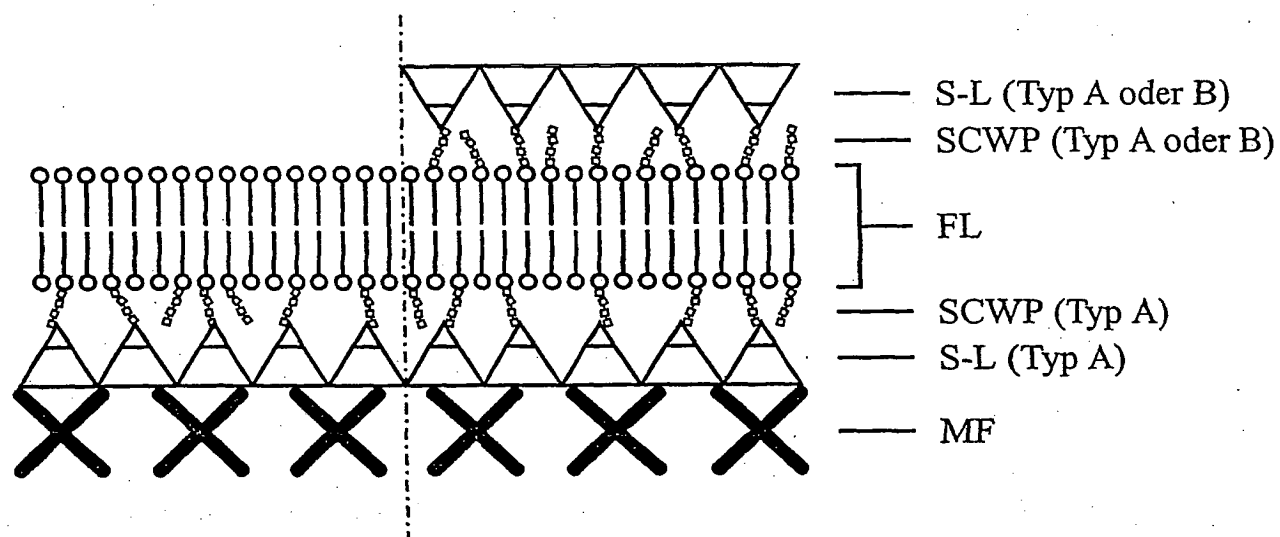


Fig.8

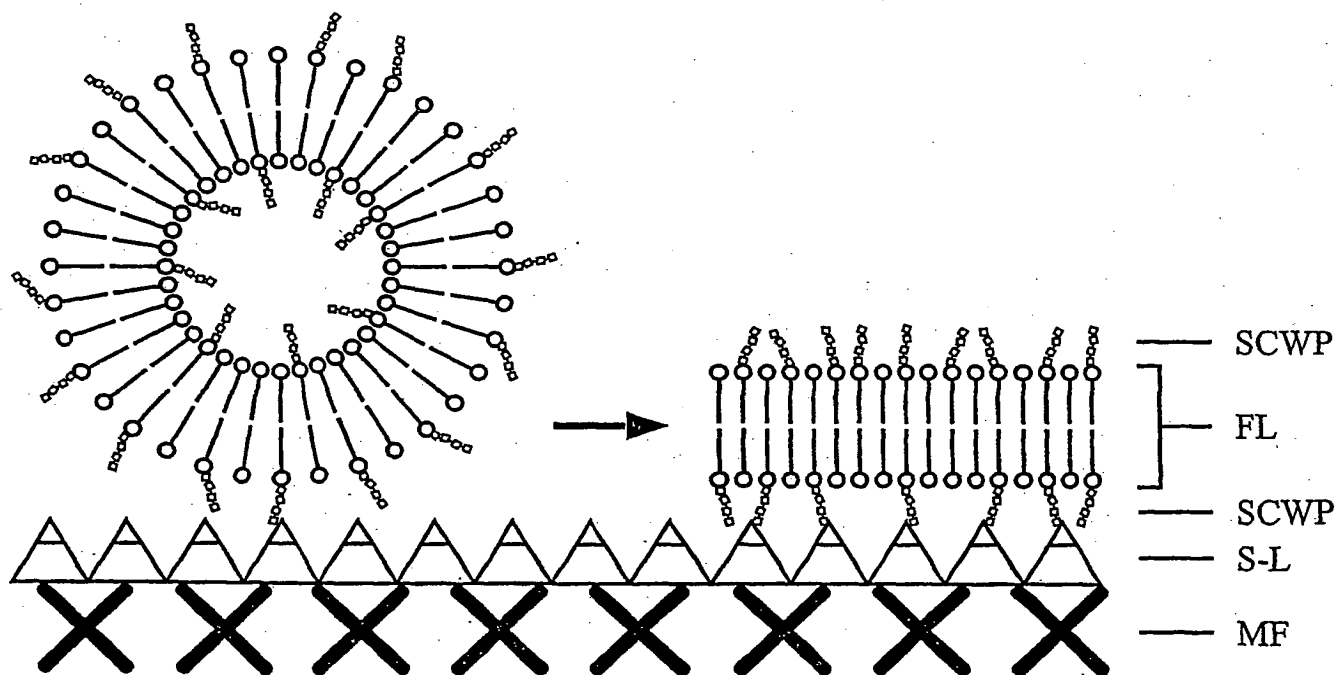


Fig.9

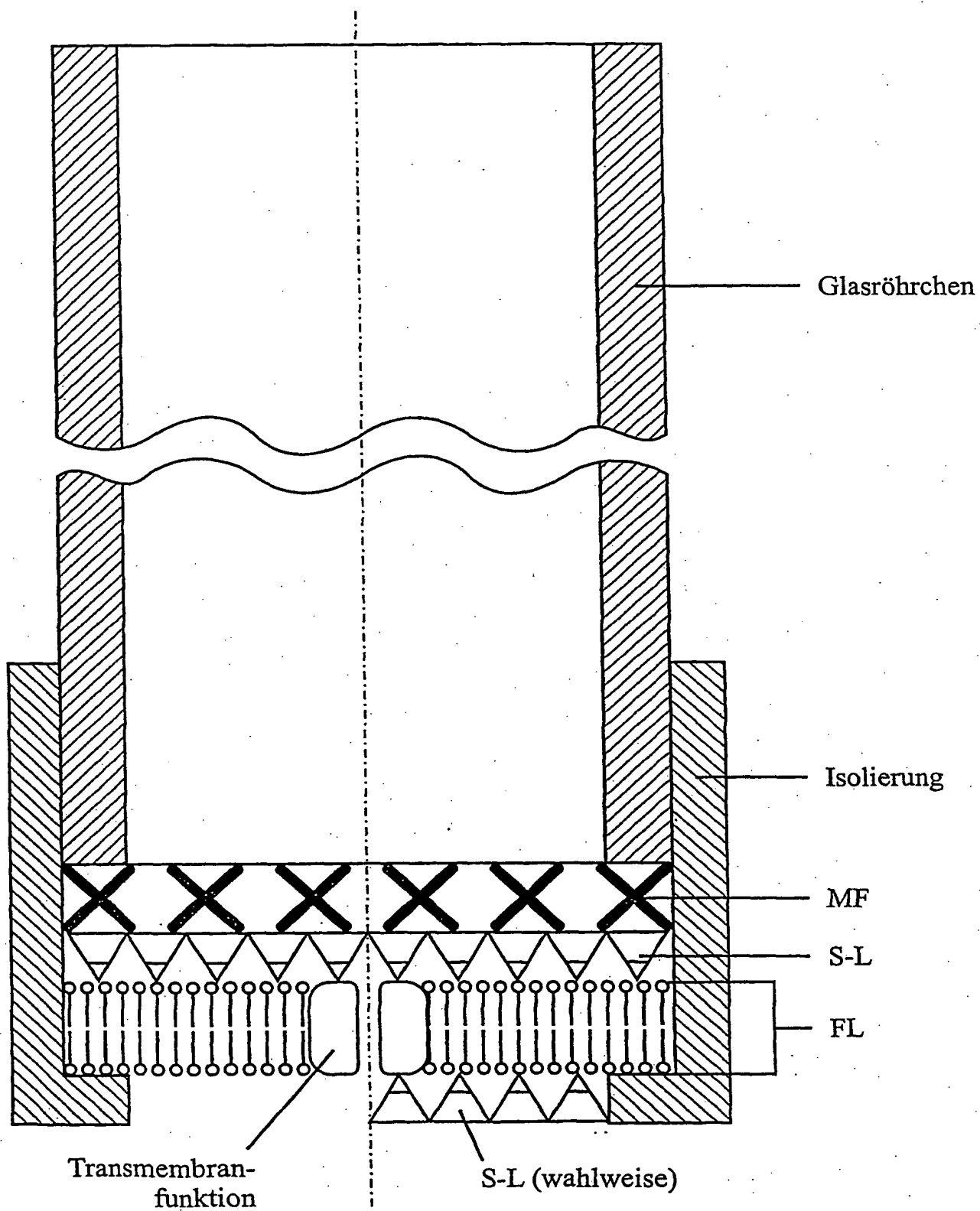


Fig.10

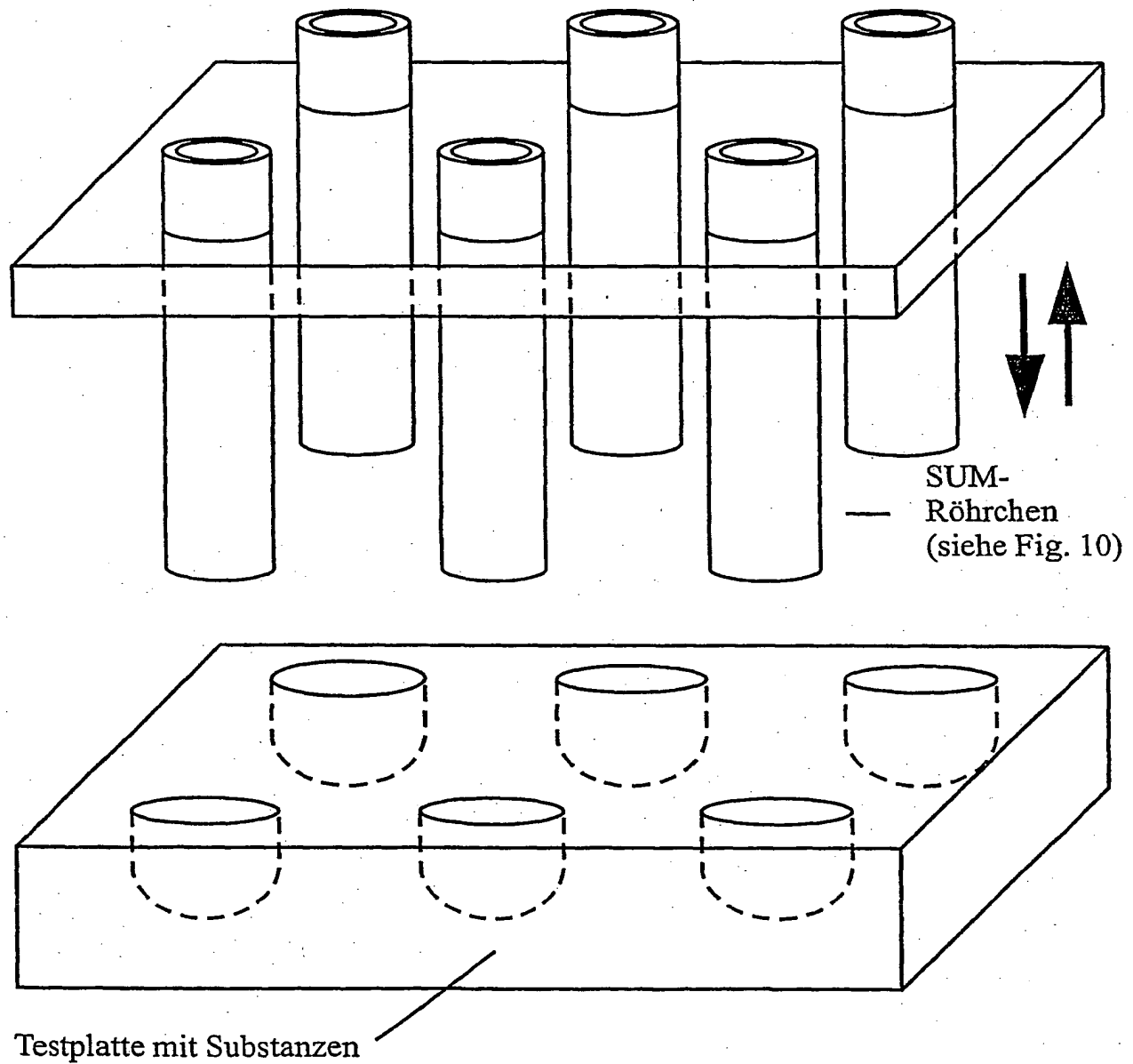


Fig.11

Mizellen aus Molekülen Typ Fig. 5

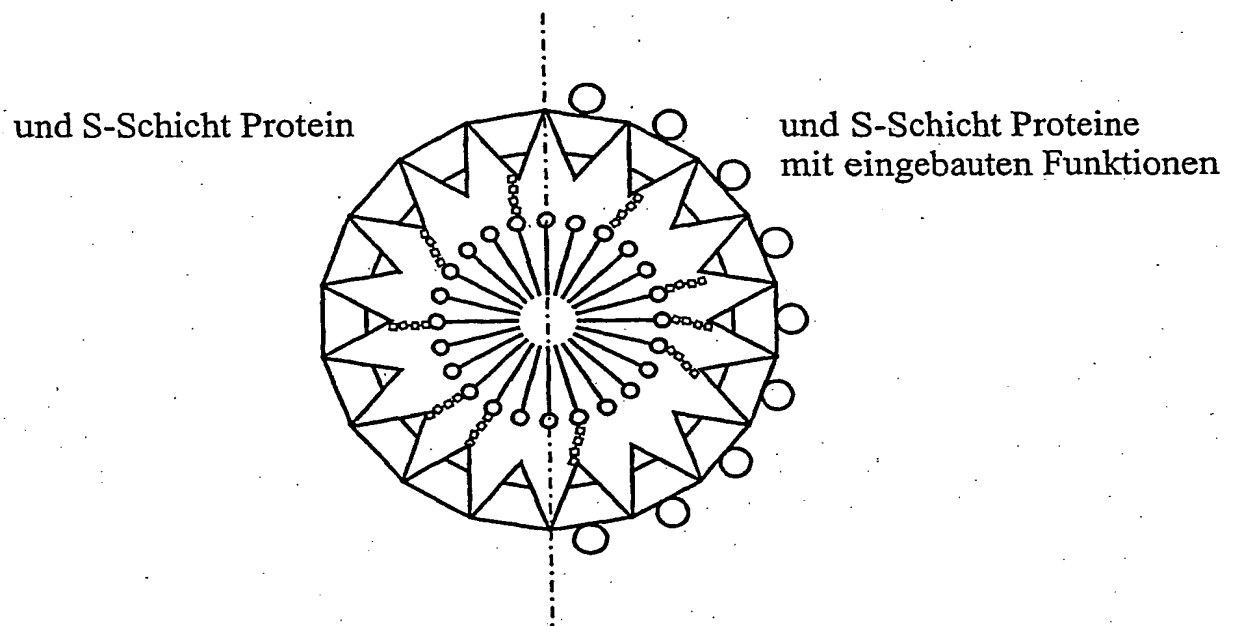


Fig.12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/AT 01/00122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K17/12 B01D71/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K B01D C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 886 604 A (U. SLEYTR) 12 December 1989 (1989-12-12) column 3, line 3 - line 40; claims 1-39	1, 15, 26, 27
X	US 4 752 395 A (U. SLEYTR) 21 June 1988 (1988-06-21) cited in the application the whole document	1, 15, 26, 27
A	WO 89 09406 A (U. SLEYTR) 5 October 1989 (1989-10-05) the whole document	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 2001

Date of mailing of the international search report

21/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luethe, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/RI 01/00122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4886604 A	12-12-1989	AT 385428 B	25-03-1988
		AT 382321 B	10-02-1987
		AT 324785 A	15-09-1987
		WO 8603685 A	03-07-1986
		AT 64544 T	15-07-1991
		CA 1307632 A	22-09-1992
		DE 3583298 D	25-07-1991
		DK 397586 A,B,	20-08-1986
		EP 0207100 A	07-01-1987
		HU 44446 A,B	28-03-1988
		IL 77419 A	31-03-1989
		JP 5057014 B	23-08-1993
		AT 406984 A	15-07-1986
		DD 251080 A	04-11-1987
		DE 3582324 D	02-05-1991
		EP 0189019 A	30-07-1986
		ZA 8509780 A	27-08-1986
US 4752395 A	21-06-1988	AT 381463 A	27-10-1986
		AT 79784 A	15-01-1986
		AT 65716 T	15-08-1991
		CA 1286065 A	16-07-1991
		DD 237793 A	30-07-1986
		DK 517485 A,B,	08-11-1985
		WO 8504111 A	26-09-1985
		EP 0154620 A	11-09-1985
		HU 200704 B	28-08-1990
		HU 43501 A	30-11-1987
		IL 74530 A	31-07-1988
		JP 4054485 B	31-08-1992
		JP 61501619 T	07-08-1986
		US 4849109 A	18-07-1989
		US 5028335 A	02-07-1991
		ZA 8501706 A	27-11-1985
WO 8909406 A	05-10-1989	AT 123339 T	15-06-1995
		AU 634960 B	11-03-1993
		AU 3435789 A	16-10-1989
		DE 58909265 D	06-07-1995
		EP 0362339 A	11-04-1990
		JP 2504282 T	06-12-1990
		JP 2708590 B	04-02-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. es Aktenzeichen

PCT/AT 01/00122

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K17/12 B01D71/74

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K B01D C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 886 604 A (U. SLEYTR) 12. Dezember 1989 (1989-12-12) Spalte 3, Zeile 3 - Zeile 40; Ansprüche 1-39	1, 15, 26, 27
X	US 4 752 395 A (U. SLEYTR) 21. Juni 1988 (1988-06-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1, 15, 26, 27
A	WO 89 09406 A (U. SLEYTR) 5. Oktober 1989 (1989-10-05) das ganze Dokument	1-27

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. August 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/08/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Luethe, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern Zeichen

PCT/AT 01/00122

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4886604 A	12-12-1989	AT 385428 B	25-03-1988
		AT 382321 B	10-02-1987
		AT 324785 A	15-09-1987
		WO 8603685 A	03-07-1986
		AT 64544 T	15-07-1991
		CA 1307632 A	22-09-1992
		DE 3583298 D	25-07-1991
		DK 397586 A, B,	20-08-1986
		EP 0207100 A	07-01-1987
		HU 44446 A, B	28-03-1988
		IL 77419 A	31-03-1989
		JP 5057014 B	23-08-1993
		AT 406984 A	15-07-1986
		DD 251080 A	04-11-1987
		DE 3582324 D	02-05-1991
		EP 0189019 A	30-07-1986
		ZA 8509780 A	27-08-1986
US 4752395 A	21-06-1988	AT 381463 A	27-10-1986
		AT 79784 A	15-01-1986
		AT 65716 T	15-08-1991
		CA 1286065 A	16-07-1991
		DD 237793 A	30-07-1986
		DK 517485 A, B,	08-11-1985
		WO 8504111 A	26-09-1985
		EP 0154620 A	11-09-1985
		HU 200704 B	28-08-1990
		HU 43501 A	30-11-1987
		IL 74530 A	31-07-1988
		JP 4054485 B	31-08-1992
		JP 61501619 T	07-08-1986
		US 4849109 A	18-07-1989
		US 5028335 A	02-07-1991
		ZA 8501706 A	27-11-1985
WO 8909406 A	05-10-1989	AT 123339 T	15-06-1995
		AU 634960 B	11-03-1993
		AU 3435789 A	16-10-1989
		DE 58909265 D	06-07-1995
		EP 0362339 A	11-04-1990
		JP 2504282 T	06-12-1990
		JP 2708590 B	04-02-1998

